



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

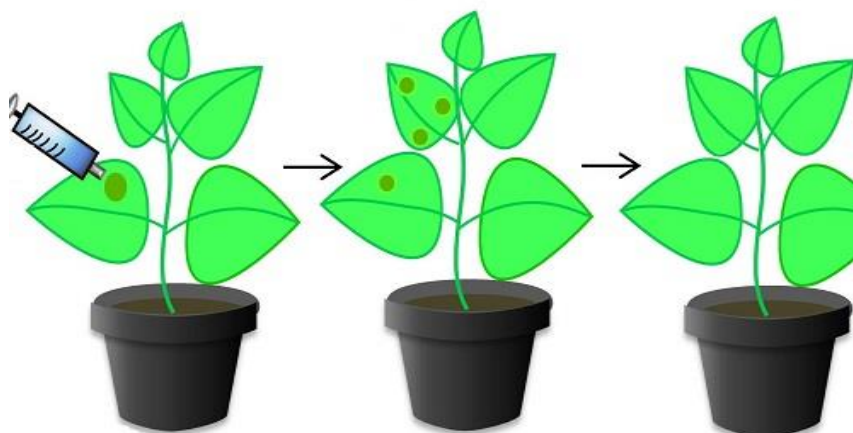
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Απόκριση *hpaB*-διαγονιδιακών φυτών του είδους *N. benthamiana*
ως προς την ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών καταπονήσεων»

ΑΔΑΜΟΠΟΥΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ



Επιβλέπουσα: Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια, Π.Θ.

ΒΟΛΟΣ 2021

Απόκριση *hpaB*-διαγονιδιακών φυτών του είδους *N. benthamiana* ως
προς την ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών καταπονήσεων

Αδαμόπουλος Ευάγγελος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παυλή Ουρανία, Επικ. Καθηγήτρια, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας
Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ιμπραχίμ-Αβραάμ Χα, Καθηγητής, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας
Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παναγιώτης Μαδέσης, Επικ. Καθηγητής, Μοριακή Βιολογία Φυτών, Τμήμα
Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή, πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά τη διάρκεια των ακαδημαϊκών ετών 2109-2020.

Η ολοκλήρωση της διατριβής μου δεν θα ήταν δυνατή χωρίς τη βοήθεια, την στήριξη και την καθοδήγηση ορισμένων ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιβλέπουσα μου κα. Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, τόσο για την ανάθεση του θέματος όσο και για την στήριξη της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων καθώς και της συγγραφής και της διόρθωσης της διατριβής μου.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Νικολέτα Μητσοπούλου, υποψήφια διδάκτορα Γενετικής Βελτίωσης Φυτών για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις της καθώς και την κα. Ευαγγελία Παναγιωτάκη, μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, για την άριστη συνεργασία και το θερμό περιβάλλον κατά την εκπόνηση των πειραμάτων στο Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στους φίλους μου και στην οικογένεια μου για την στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς τη συμβολή τους δεν θα είχα επιτύχει τους στόχους μου και δεν θα έκλεινε όμορφα αυτό το ταξίδι των φοιτητικών μου χρόνων!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, ένας σημαντικός αριθμός ερευνών καταδεικνύει ότι τα γονίδια που προέρχονται από παθογόνα, και δη φυτοπαθογόνα βακτήρια, κατά την ενδογενή έκφρασή τους σε φυτά έχουν την ικανότητα επαγωγής ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων. Είναι ευρέως γνωστό ότι τα φυτοπαθογόνα βακτήρια εγχύουν τις βακτηριακές πρωτεΐνες στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III (T3SS). Στο πλαίσιο αυτό, τα γονίδια που κωδικοποιούν δομικά συστατικά του T3SS καθώς και πρωτεΐνες-τελεστές έχουν αξιοποιηθεί ως μέσο για την επίτευξη διαγονιδιακής ανθεκτικότητας. Ο ρόλος των τελεστών είναι διττός καθώς στους βακτηριακούς τους φορείς εξυπηρετούν στην παθογένεια, δρώντας ως παράγοντες μολυσματικότητας, ενώ σε ανθεκτικούς γονοτύπους των φυτών ξενιστών ή σε φυτά μη ξενιστές, δρουν ως παράγοντες αμολυσματικότητας, οδηγώντας συχνά στην επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας.

Το γονίδιο *hpaB*, που εμφανίζει υψηλή συντήρηση στο γένος *Xanthomonas*, έχει αποδειχθεί ότι εξυπηρετεί την παθογόνο ικανότητα του βακτηριακού του φορέα, συμβάλλοντας στην έκκριση πρωτεϊνών μέσω του T3SS. Με δεδομένο ότι η δράση του *hpaB in planta* δεν έχει μελετηθεί, στόχο της διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hpaB*, από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* ως προς την ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών καταπονήσεων. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε συγκριτικά η απόκριση διαγονιδιακών *hpaB*-σειρών και φυτών αγρίου τύπου στη μόλυνση με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των διαγονιδιακών φυτών βασίστηκε στη συμπτωματολογία, την αποίκιση του βακτηρίου και την περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο.

Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της παρούσας διατριβής υποδεικνύουν ότι οι *hpaB*-σειρές δεν εμφανίζουν στο σύνολό τους προηγμένη ανθεκτικότητα έναντι του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tabaci*, ωστόσο παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την απόκριση των *hpaB*-σειρών στη βακτηριακή μόλυνση. Ειδικότερα, η σειρά *hpaB 6-1* χαρακτηρίστηκε από ηπιότερη συμπτωματολογία, ενώ οι σειρές *hpaB 1-2* και *hpaB 4-2* εμφάνισαν μικρότερη αποίκιση συγκριτικά με τις υπόλοιπες σειρές και τα φυτά αγρίου τύπου. Οι διαφορές μεταξύ των *hpaB*-σειρών αποδίδονται στην τυχαία

ένθεση του γονιδίου *hpaB* καθώς οι σειρές συνιστούν απόγονους αυτογονιμοποίησης διαφορετικών συμβάντων μετασχηματισμού. Με δεδομένες τις παρατηρηθείσες διαφορές, τα ευρήματα της διατριβής μπορεί να αποτελέσουν τη βάση για την περαιτέρω μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hpaB* σε διαγονιδιακά φυτά στοχεύοντας στη βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων.

Πίνακας Περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Αλληλεπίδραση των φυτών με το περιβάλλον ανάπτυξής τους.....	2
1.2 Κύριοι παράγοντες καταπόνησης.....	4
1.2.1 Αβιοτικές καταπονήσεις.....	5
1.2.2 Βιοτικές καταπονήσεις.....	7
1.3 Καταπόνηση από φυτοπαθογόνα βακτήρια.....	8
1.4 Μηχανισμοί άμυνας των φυτών έναντι καταπονήσεων.....	9
1.4.1 Αντίδραση Υπερευαισθησίας.....	11
1.5 Βελτίωση φυτών και ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων.....	13
1.5.1 Μεταφορά γονιδίων μέσω του <i>Agrobacterium</i>	14
1.5.2 Μεταφορά DNA με σωματιδιακούς φορείς.....	15
1.5.3 Άμεση μεταφορά DNA.....	16
1.6 Προσεγγίσεις της Γενετικής Μηχανικής στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων.....	16
1.6.1 Ανθεκτικότητα που προέρχεται από παθογόνα	17
1.6.2 Γονιδιακή Σίγηση.....	17
1.6.3 Αντισώματα.....	18
1.7 Γονίδια που προέρχονται από φυτοπαθογόνα βακτήρια.....	19
1.8 Τα γονίδια <i>hpaA</i> και <i>hpaB</i>	21
1.9 Το φυτό-μοντέλο <i>Nicotiana benthamiana</i>	22
Σκοπός της μελέτης.....	24
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
2.1 Φυτικό υλικό.....	25
2.2 Ανάπτυξη διαγονιδιακών <i>hpaB</i> -φυτών.....	25
2.3 Τεχνητή μόλυνση των φυτών με το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> ...	27
2.4 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	28
2.5 Μέτρηση του ποσοστού χλωροφύλλης πριν και μετά την τεχνητή μόλυνση.....	30
2.6 Στατιστική ανάλυση.....	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
3.1 Επίδραση της έκφρασης του <i>hpaB</i> στο φαινότυπο των διαγονιδιακών	

φυτών.....	32
3.2 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	32
3.2.1 Συγκριτική αξιολόγηση της συμπτωματολογίας των φυτών.....	33
3.2.2 Συγκριτική αξιολόγηση της αποίκησης του βακτηρίου στα μολυσμένα φυτά.....	37
3.2.2.1 Αποίκηση του βακτηρίου 24h μετά τη μόλυνση.....	37
3.2.2.2 Αποίκηση του βακτηρίου 72h μετά τη μόλυνση.....	40
3.3 Συγκριτική αξιολόγηση των τιμών χλωροφύλλης πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	42
3.3.1 Τιμές χλωροφύλλης πριν την μόλυνση με το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	42
3.3.2 Τιμές χλωροφύλλης μετά την μόλυνση με το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	43
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	52
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53
7.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	66

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 3.1: Αποίκιση του βακτηρίου σε φυτά του είδους *N. benthamiana*, 24 ώρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 3.2: Αποίκιση του βακτηρίου σε φυτά του είδους *N. benthamiana*, 72 ώρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 3.3: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaB*-διαγονιδιακές σειρές, πριν τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 3.4: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaB*-διαγονιδιακές σειρές, 10 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 7.1: Τιμές χλωροφύλλης των φυτών άγριου τύπου (WT), πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 7.2: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaB* 1-2, πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 7.3: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaB* 2-2, πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 7.4: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaB* 4-2, πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 7.5: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaB* 6-1, πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 7.6: Μέσος όρος τιμών χλωροφύλλης των μαρτύρων και των μολυσμένων φυτών ανά κατηγορία φυτών (WT και *hpaB*-), πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Κατάλογος Γραφημάτων

Διάγραμμα 3.1: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaB*-διαγονιδιακές σειρές, πριν τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Διάγραμμα 3.2: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaB*-διαγονιδιακές σειρές, 10 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1: Διάγραμμα των βέλτιστων ορίων ανάπτυξης των φυτικών οργανισμών και εμφάνιση συμπτωμάτων, ανάλογα με την ένταση του παράγοντα καταπόνησης.

Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων καταπόνησης των φυτών καθώς και της απόκρισής τους σε κάθε ένα στάδιο.

Εικόνα 1.3: Απόκριση του φυτού έναντι αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων.

Εικόνα 1.4: Αντίδραση Υπερευαισθησίας σε φύλλο του είδους *Arabidopsis thaliana*.

Εικόνα 1.5: Διαδικασία γενετικού μετασχηματισμού ενός φυτικού οργανισμού μέσω του *Agrobacterium tumefaciens*.

Εικόνα 1.6: Σχηματική απεικόνιση της βελονοειδούς μορφής του εκκριτικού συστήματος τύπου III (Type III secretion system-T3SS).

Εικόνα 2.1: Βλάστηση των διαγονιδιακών *hpaB*-σειρών του είδους *N. benthamiana* σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου.

Εικόνα 2.2: Ανάπτυξη των διαγονιδιακών *hpaB*-σειρών του είδους *N. benthamiana* σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου.

Εικόνα 2.3: Διαδικασία δημιουργίας των διαδοχικών αραιώσεων σε εκχυλίσματα φυτών (*hpaB*-σειρές και WT) του είδους *N. benthamiana*, έπειτα από μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Εικόνα 3.1: Συγκριτική απεικόνιση των *hpaB*-φυτών και των φυτών αγρίου τύπου (WT). Παρατηρείται ομοιότητα ως προς τα μορφολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των φυτών. **A.** φυτά αγρίου τύπου **B.** φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaB 6-1*.

Εικόνα 3.2: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, δύο ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Φυτά άγριου τύπου (WT), όπου είναι ορατή η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων στα μεσαία φύλλα **B.** Ανώτερο φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hpaB 1-2* **Γ.** Μεσαίο φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hpaB 2-2*, όπου είναι ορατή η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων **Δ.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaB 6-1*, όπου είναι ορατή η εμφάνιση συμπτωμάτων ήπιου μαρασμού.

Εικόνα 3.3: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, τέσσερις ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Φυτά άγριου τύπου (WT), όπου είναι εμφανής η ανάπτυξη εκτεταμένων χλωρωτικών κηλίδων στα μεσαία φύλλα **B.** Ανώτερο φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hpaB* 4-2, όπου διακρίνονται χλωρωτικές κηλίδες **Γ.** Φυτά της σειράς *hpaB* 1-2, τα οποία εμφανίζουν κύρτωση του ελάσματος προς τα κάτω **Δ.** Φυτά της σειράς *hpaB* 6-1, τα οποία εμφανίζουν ήπια χλώρωση.

Εικόνα 3.4: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, επτά ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Φυτά άγριου τύπου (WT), όπου είναι εμφανής η ανάπτυξη έντονων και εκτεταμένων χλωρωτικών κηλίδων στα μεσαία και ανώτερα φύλλα **B.** Φυτά της σειράς *hpaB* 4-2, που εμφανίζουν χλωρωτικές κηλίδες στα μεσαία και ανώτερα φύλλα **Γ.** Φυτά της σειράς *hpaB* 2-2 που εμφανίζουν χλωρωτικές κηλίδες στα μεσαία και ανώτερα φύλλα και κύρτωση του ελάσματος προς τα κάτω **Δ.** Φυτά της σειράς *hpaB* 6-1 με συμπτώματα ήπιας χλώρωσης του ελάσματος.

Εικόνα 3.5: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, δέκα ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Φυτά άγριου τύπου (WT), όπου είναι εμφανής η ανάπτυξη έντονων και εκτεταμένων χλωρωτικών κηλίδων στα μεσαία και ανώτερα φύλλα **B.** Φυτά της σειράς *hpaB* 1-2 που εμφανίζουν χλωρωτικές κηλίδες και κύρτωση του ελάσματος προς τα κάτω **Γ.** Φυτά της σειράς *hpaB* 2-2 που εμφανίζουν κύρτωση του ελάσματος προς τα κάτω **Δ.** Φυτά της σειράς *hpaB* 4-2 που εμφανίζουν έντονες χλωρωτικές κηλίδες στα ανώτερα φύλλα **Ε.** Φυτά της σειράς *hpaB* 6-1 με συμπτώματα ήπιας χλώρωσης του ελάσματος.

Εικόνα 3.6: Συγκριτική απεικόνιση των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε φυτικό ιστό του είδους *Nicotiana benthamiana*, 24 ώρες έπειτα από τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Τα τρυβλία εμφανίζονται διαιρεμένα και κάθε κελί αφορά στις διαφορετικές διαδοχικές αραιώσεις (αρχικό εκχύλισμα, 1/10, 1/100, 1/1000) **A.** Ιστός που προέρχεται από υγιή, μη μολυσμένο φυτό της σειράς *hpaB* 2-2 (μάρτυρας) **B.** Ιστός που προέρχεται από φυτό αγρίου τύπου (WT) **Γ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB* 1-2 **Δ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς

hpaB 2-2 **Ε**. Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB* 4-2 **ΣΤ**. Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB* 6-1.

Εικόνα 3.7: Συγκριτική απεικόνιση των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε φυτικό ιστού του είδους *Nicotiana benthamiana*, 72 ώρες έπειτα από τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Τα τρυβλία εμφανίζονται διαιρεμένα και κάθε κελί αφορά στις διαφορετικές διαδοχικές αραιώσεις (αρχικό εκχύλισμα, 1/10, 1/100, 1/1000) **Α**. Ιστός που προέρχεται από υγιή, μη μολυσμένο φυτό της σειράς *hpaB* 2-2 (μάρτυρας) **Β**. Ιστός που προέρχεται από φυτό αγρίου τύπου (WT) **Γ**. Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB* 1-2 **Δ**. Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB* 2-2 **Ε**. Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB* 4-2 **ΣΤ**. Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB* 6-1.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Γενικά

Οι φυτικοί οργανισμοί έχουν μία συνεχή αλληλεπίδραση με το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται. Ως οργανισμοί που χαρακτηρίζονται από αδυναμία κίνησης, τα φυτά υπόκεινται συχνά σε δυσμενείς αγροκλιματικές συνθήκες, γνωστές και ως καταπονήσεις, οι οποίες διαταράσσουν τις φυσιολογικές λειτουργίες τους και οδηγούν σε μείωση της αύξησης, της ανάπτυξης και της παραγωγικότητάς τους. Με βάση τη φύση τους, οι καταπονήσεις διακρίνονται σε βιοτικές και αβιοτικές, ενώ σε κάθε περίπτωση η επίδρασή τους στα φυτά είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ένταση και τη διάρκειά τους.

Με δεδομένη την αδυναμία άμμεσης φυγής, όπως συμβαίνει με τους ζωικούς οργανισμούς, οι φυτικοί οργανισμοί, σε συνδυασμό με το περιβάλλον, έχουν αναπτύξει ποικίλους και εξειδικευμένους μηχανισμούς άμυνας και προσαρμογές σε ενδεχόμενες αλλαγές που διαδραματίζονται στο εύρυθμο περιβάλλον τους. Η ενεργοποίηση των εν λόγω μηχανισμών προϋποθέτει αρχικά την αντίληψη της πηγής του ερεθίσματος και, εν συνεχεία, τη μεταγωγή του σήματος σε επίπεδο ολόκληρου φυτού. Εντούτοις, οι μηχανισμοί άμυνας παρουσιάζουν μειωμένη δυνατότητα αντιμετώπισης του εκάστοτε παράγοντα καταπόνησης, με αποτέλεσμα τα φυτά να συνεχίζουν να πλήττονται από καταπονήσεις.

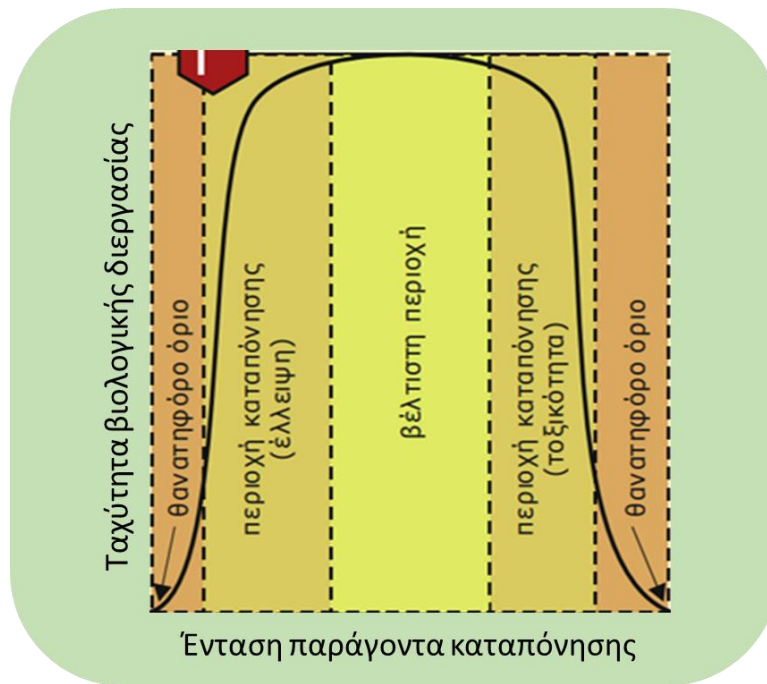
Σύμφωνα με τον πλέον γενικευμένο ορισμό, η Βελτίωση των φυτών «είναι η τέχνη και η επιστήμη της βελτίωσης της κληρονομικότητας των φυτών για χαρακτηριστικά που ενδιαφέρουν τον άνθρωπο». Η Βελτίωση ως επιστήμη στοχεύει στη δημιουργία σύγχρονων υψηλοαποδοτικών ποικιλιών που ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων προκειμένου να επιτυγχάνεται ελαχιστοποίηση των σχετικών απωλειών απόδοσης υπό συνθήκες καταπόνησης. Στο πλαίσιο δημιουργίας ανθεκτικών ποικιλιών, η βελτιωτική διαδικασία περιλαμβάνει ένα εύρος μεθόδων και τεχνολογιών, οι οποίες εκτείνονται από τις κλασικές προσεγγίσεις γενετικού υβριδισμού και επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων έως και τις σύγχρονες προσεγγίσεις της υποβοηθούμενης από μοριακούς δείκτες επιλογής (MAS) και της Γενετικής Μηχανικής. Η τελευταία, άνοιξε δρόμο για ένα μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον, αφού προσφέρει τη δυνατότητα απομόνωσης

γονιδίων, ανεξαρτήτως προέλευσης και ταξινομικών εμποδίων, και ενσωμάτωσής τους σε φυτικούς οργανισμούς. Είναι αξιοσημείωτο ότι η Γενετική Μηχανική χαρακτηρίζεται από μία πληθώρα διαφορετικών προσεγγίσεων και εφαρμογών, οι οποίες ωστόσο υπόκεινται σε περιορισμούς που άπτονται των θεμάτων βιοηθικής.

1.1 Αλληλεπίδραση των φυτών με το περιβάλλον ανάπτυξής τους

Η φυσιολογική ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών επιτυγχάνεται απρόσκοπτα όταν στο περιβάλλον ανάπτυξής τους επικρατούν οι ιδανικές συνθήκες. Με τον όρο καταπόνηση, νοείται η δυσμενής επίδραση παραγόντων του περιβάλλοντος, η οποία διαταράσσει την εύρυθμη λειτουργία φυσιολογικών μηχανισμών στο φυτικό οργανισμό, οδηγώντας σε αδυναμία επίτευξης του πλήρους γενετικού δυναμικού του (Taiz, et al., 2017). Απόρροια της επικράτησης δυσμενών παραγόντων είναι η απόκλιση από το επιθυμητό εύρος ανοχής, εκτός του οποίου παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης και εκδήλωση συμπτωμάτων καταπόνησης. Κατά την περίπτωση όπου η ένταση του παράγοντα καταπόνησης δεν παρακωλύει την ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου, αναφέρεται ότι τα φυτά αναπτύσσονται εντός των ορίων της βιολογικής τους δραστηριότητας. Ωστόσο, σε περιπτώσεις όπου η ένταση του παράγοντα καταπόνησης οδηγεί σε βλάβες που συνοδεύονται από αδυναμία ολοκλήρωσης του βιολογικού τους κύκλου, αναφέρεται ότι τα φυτά αναπτύσσονται σε θανατηφόρα όρια βιολογικής δραστηριότητας, κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται ως μη αναστρέψιμη (Καραμπουρνιώτης, κ.α., 2012) (Εικόνα 1.1).

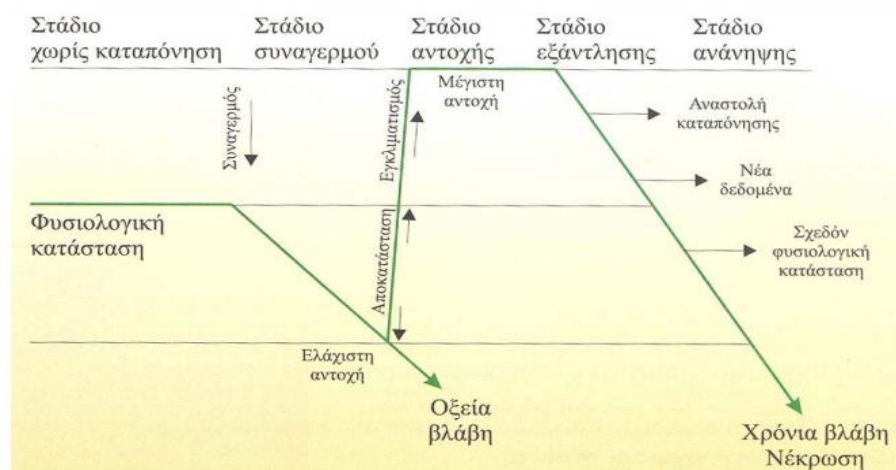
Παράγοντες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην έκβαση της αλληλεπίδρασης φυτού-παράγοντα καταπόνησης είναι το φυτικό είδος, η διάρκεια, η ένταση της καταπόνησης, η κατανομή αυτής στο χώρο και το χρόνο καθώς και ο συνδυασμός της με πρόσθετους παράγοντες καταπόνησης που επιδρούν ταυτόχρονα (Lichtenthaler, 1998). Πέραν της επιβίωσης ή όχι ενός φυτικού οργανισμού, η εκτίμηση των απωλειών που οφείλονται στην καταπόνηση γίνεται με πληθώρα παραμέτρων αξιολόγησης, συμπεριλαμβανομένης της συσσώρευσης βιομάζας, της παραγόμενης ποσότητας και ποιότητας του γεωργικού προϊόντος, κ.α. (Καραμπουρνιώτης, κ.α., 2012).



Εικόνα 1.1: Διάγραμμα των βέλτιστων ορίων ανάπτυξης των φυτικών οργανισμών και εμφάνισης συμπτωμάτων, ανάλογα με την ένταση του παράγοντα καταπόνησης (Πηγή: τροποποίηση από Καραμπουρνιώτης, κ.α., 2012).

Με γνώμονα την αρχική αντίληψη του Selye (1936) περί καταπονήσεων των φυτών καθώς και τις θεωρίες των Larcher και Lichtenthaler (1996), η καταπόνηση των φυτών λαμβάνει χώρα σε τέσσερα στάδια ως ακολούθως:

1. Στάδιο συναγερμού, το οποίο αφορά στα αρχικά στάδια της καταπόνησης επηρεάζοντας τις φυσιολογικές λειτουργίες του φυτικού οργανισμού.
2. Στάδιο αντοχής, στο οποίο ο φυτικός οργανισμός προσαρμόζεται, εισάγεται σε διαδικασία επιδιόρθωσης και επαναπρογραμματισμού με στόχο την ανθεκτικότητα στον εκάστοτε παράγοντα καταπόνησης.
3. Στάδιο εξάντλησης, κατά το οποίο η προσαρμογή του φυτού στις νέες συνθήκες είναι αδύνατη διότι η ένταση της καταπόνησης είναι αρκετά υψηλή και μπορεί να προκαλέσει ακόμα και νέκρωση του φυτού.
4. Στάδιο ανάνηψης, στο οποίο ο φυτικός οργανισμός επαναπροσαρμόζεται στις αρχικές του φυσιολογικές λειτουργίες εφόσον έχει απομακρυνθεί ο παράγοντας καταπόνησης. Το στάδιο αυτό λαμβάνει χώρα υπό την αίρεση ότι οι βλάβες που προκλήθηκαν είναι αναστρέψιμες (Wang, et al., 2006) (Εικόνα 1.2).



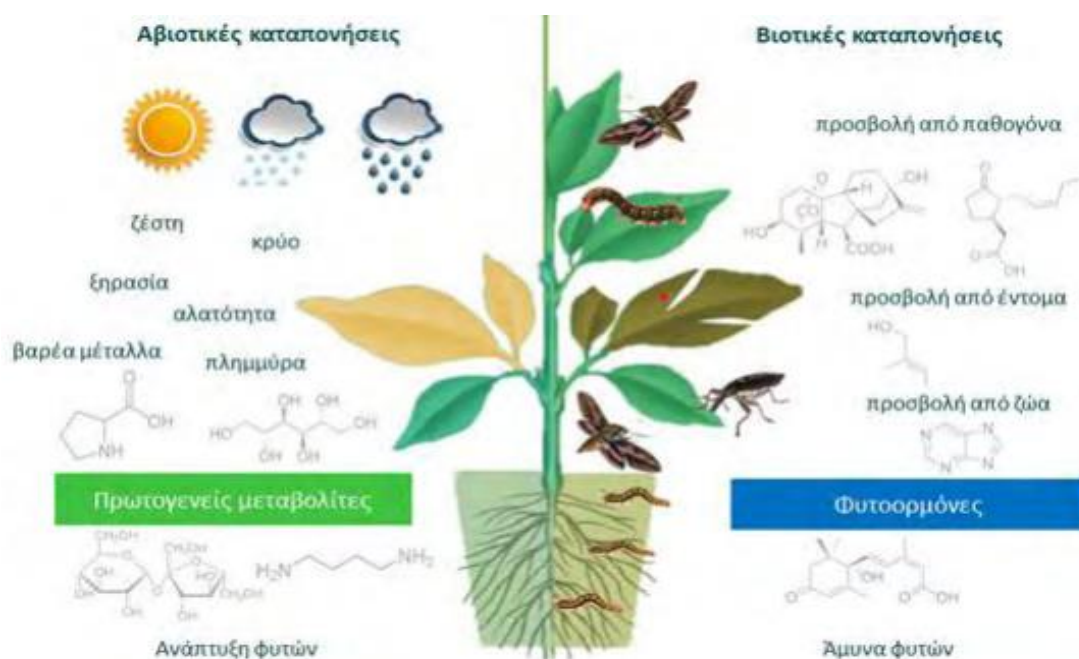
Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων καταπόνησης των φυτών καθώς και της απόκρισής τους σε κάθε ένα στάδιο (Πηγή: Γαλάτης κ.α., 2003).

1.2 Κύριοι παράγοντες καταπόνησης

Στο περιβάλλον όπου αναπτύσσονται, τα φυτά υπόκεινται σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών παραγόντων οι οποίοι δυνητικά προκαλούν ποικίλες αλλαγές σε μορφολογικό, βιολογικό, βιοχημικό και μοριακό επίπεδο (Jackson, 1986; Wang, et al., 2001), περιορίζοντας την ανάπτυξή τους και προκαλώντας ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση του παραγόμενου προϊόντος. Όπως προαναφέρθηκε, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες καταπόνησης διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: α) τους αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης και β) τους βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης (Εικόνα 1.3). Κατά τη φάση της συνεξέλιξης των φυτών με το περιβάλλον, τα φυτά έχουν αναπτύξει πληθώρα μηχανισμών προκειμένου να αντιλαμβάνονται τις περιβαλλοντικές μεταβολές και να ανταποκρίνονται με τρόπο ώστε να περιορίζονται οι επιπτώσεις των αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων καταπόνησης διατηρώντας την ικανότητα ανάπτυξης και αναπαραγωγής τους (Atkinson & Urwin, 2012).

Παρά το βιοχημικό οπλοστάσιο των φυτών, οι βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις εξακολουθούν να περιορίζουν σημαντικά την ανάπτυξη και παραγωγικότητα των καλλιεργειών σε παγκόσμιο επίπεδο. Ως εκ τούτου, η αναβάθμιση της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων αποτελεί βασικότατο στόχο των βελτιωτικών προγραμμάτων των καλλιεργούμενων φυτών. Στο πλαίσιο αυτό, οι επιπτώσεις των καταπονήσεων στα φυτά μελετώνται είτε σε συνθήκες αγρού είτε σε

εργαστηριακές συνθήκες. Παρά το γεγονός ότι η αξιολόγηση σε πειραματικούς αγρούς προσομοιάζει τις πραγματικές συνθήκες καλλιέργειας, συχνά προτιμάται η εργαστηριακή ανάλυση υπό ελεγχόμενες συνθήκες καθώς είναι εφικτή η εξασφάλιση ομοιόμορφων συνθηκών και η αποφυγή επικράτησης πλέον του ενός παραγόντων καταπόνησης (Suzuki, et al., 2014).



Εικόνα 1.3: Απόκριση του φυτού έναντι αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων (Πηγή: <http://orbitbiotech.com/temperature-stress-plants-high-temperature-stress/responses-of-a-plant-againstabiotic-stress-orbit-biotech-training/>).

1.2.1 Αβιοτικές καταπονήσεις

Οι αβιοτικοί παράγοντες καταπόνησης μπορεί να είναι φυσικοί, χημικοί ή ανθρωπογενούς δραστηριότητας (Verma, et al., 2013). Στους φυσικούς παράγοντες συγκαταλέγονται η ηλιακή ακτινοβολία, οι ακραίες θερμοκρασίες, η υδατική καταπόνηση (ξηρασία ή περίσσεια νερού) καθώς και οι μηχανικές βλάβες (άνεμος, σχηματισμός πάγου). Στους χημικούς παράγοντες περιλαμβάνεται η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών στο εδαφικό διάλυμα, η αλατότητα, η περιεκτικότητα σε ξενοβιοτικές ουσίες, όπως τα βαρέα μέταλλα, καθώς και η σύσταση του αέριου περιβάλλοντος (έλλειψη O_2 , CO_2). Τέλος, στους ανθρωπογενείς παράγοντες

καταπόνησης εντάσσονται οι δραστηριότητες που δυνητικά προκαλούν βλάβες στα φυτά, όπως οι πυρκαγιές και η ανεξέλεγκτη χρήση φυτοφαρμάκων.

Οι ανωτέρω καταπονήσεις συνιστούν τους κύριους περιοριστικούς παράγοντες στην ανάπτυξη και παραγωγικότητα των φυτών, επιφέροντας απώλειες που σε ορισμένες περιπτώσεις απειλούν τη βιωσιμότητα των καλλιεργειών (Mohanta, et al., 2017). Βάσει των πρόσφατων ερευνητικών δεδομένων, οι αβιοτικές καταπονήσεις μπορούν να προκαλέσουν απώλειες απόδοσης, της τάξης του 50 % του δυναμικού απόδοσης, στα σημαντικότερα καλλιεργούμενα είδη (Wang, et al., 2006). Είναι ενδεικτικό ότι έχει αποδειχθεί ότι το 22 % της παγκόσμιας γεωργικής έκτασης εκτίθεται σε περιβάλλον αλατότητας (FAO, 2004), ενώ παράλληλα οι περιοχές που πλήττονται από ξηρασία ολοένα και αυξάνονται (Burke, et al., 2006). Ωστόσο, σημαντική είναι και η συμβολή της κλιματικής αλλαγής στην υποβάθμιση του αγροτικού περιβάλλοντος, καθώς τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια αύξηση σε ακραία καιρικά φαινόμενα (Cohen & Leach, 2019). Προβλέπεται ότι μέχρι το τέλος του αιώνα θα υπάρξει αύξηση της θερμοκρασίας του πλανήτη από 1,5 °C έως 5,8 °C και επιπλέον αύξηση των κατακρημνίσεων σε ποσοστό 5 % έως και 15 % (Rosenzweig, et al., 2001).

Στην πλειοψηφία τους, οι φυτικοί οργανισμοί υπόκεινται σε καταπονήσεις που προκαλούνται από έναν αβιοτικό παράγοντα. Ωστόσο, συχνά τα φυτά πλήττονται από συνδυασμό αβιοτικών παραγόντων, ο οποίος προκαλεί στα φυτά μεγαλύτερης έντασης επιπτώσεις που, σε ορισμένες περιπτώσεις, αποβαίνουν περισσότερο επιζήμιες συγκριτικά με την επικράτηση ενός παράγοντα (Mittler, 2006). Στο πλαίσιο αυτό, έρευνες υποστηρίζουν ότι σιτηρά που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας και αυξημένης θερμοκρασίας ταυτόχρονα εμφάνισαν αδυναμία γεμίσματος των κόκκων καθώς και μειωμένη ικανότητα φωτοσύνθεσης (Prasad, et al., 2011). Επιπλέον, η συνδυασμένη καταπόνηση βαρέων μετάλλων και UV ακτινοβολίας σε φυτά μπιζελιού οδήγησε σε δραστική μείωση της ανάπτυξής τους (Srivastava, et al., 2012).

Από την άλλη, ένας συνδυασμός αβιοτικών καταπονήσεων μπορεί να θεωρηθεί και ωφέλιμος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη φυτών μαρουλιού σε περιβάλλον με αλατότητα και αυξημένης συγκέντρωσης CO₂, η οποία οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή βιομάζας και προηγμένη ικανότητα αντίδρασης σε οξειδωτικές στρες (Pérez-López, et al., 2013).

1.2.2 Βιοτικές καταπονήσεις

Οι φυτικοί οργανισμοί εκτίθενται συνεχώς σε περιβάλλοντα όπου καταπονούνται από βιοτικούς παράγοντες. Στους βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης εντάσσονται οι ιοί, οι μύκητες, τα βακτήρια και οι νηματώδεις καθώς και τα ζώα τα οποία μπορούν να τραυματίσουν τα φυτά αξιοποιώντας τα ως βασική πηγή τροφής τους. Επιπλέον, στους βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης περιλαμβάνονται και οι φυτικοί οργανισμοί καθώς μπορεί να προκληθεί επικάλυψη, αλληλοπάθεια ή και παρασιτισμός μεταξύ τους.

Η βιοτική καταπόνηση, ως έννοια, αφορά κυρίως τη βιολογική δραστηριότητα των φυτών, των παθογόνων οργανισμών και των ζώων. Οι βιοτικές καταπονήσεις επιφέρουν επιπτώσεις τόσο σε οικονομικό όσο και σε οικολογικό επίπεδο. Οι βιοτικοί παράγοντες καταπόνησης είναι υπεύθυνοι για την υποβάθμιση έως και κατά 35 % της συνολικής απόδοσης των καλλιεργειών (Pimentel, 1991), αντλώντας από τον ξενιστή σημαντικές ποσότητες θρεπτικών συστατικών, γεγονός που οδηγεί σε αδυναμία επιβίωσης (Gull, et al., 2019). Επιπρόσθετα, συχνά προκαλείται μείωση της φωτοσύνθεσης, η οποία παρατηρείται τόσο στην περίπτωση ιολογικών ασθενειών όσο και στα μασητικά έντομα που μειώνουν την επιφάνεια των φύλλων (Bilgin, et al., 2010).

Κατά την άμυνα έναντι καταπονήσεων, τα φυτά προκειμένου να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο έχουν αναπτύξει πληθώρα μηχανισμών που ενεργοποιούνται έπειτα από την αντίληψη του ερεθίσματος (Cushman & Bohnert, 2000). Η αλληλεπίδραση των ξενιστών με τα παθογόνα δύναται να οδηγήσει είτε σε εκδήλωση ασθένειας είτε στην εδραίωση μιας συμβιωτικής σχέσης (Tampakaki, 2014).

Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έγκειται στην αλληλεπίδραση των αβιοτικών με τους βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Στο φυσικό περιβάλλον, η υποβολή των φυτών σε βιοτικούς παράγοντες συχνά συσχετίζεται με την ταυτόχρονη επικράτηση αβιοτικών καταπονήσεων (Rejeb, et al., 2014), γεγονός που δύναται να επιφέρει θετικές ή αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη του φυτού. Ενδεικτική είναι η δυσμενής επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο είδος *Arabidopsis thaliana* αναφορικά με την ευπάθεια σε στέλεχος του μύκητα *Pseudomonas syringae*, το οποίο υπό συνθήκες απουσίας καταπόνησης δεν μπορούσε να προκαλέσει μόλυνση (Mohr & Cahill, 2003).

Αντίθετα, σε φυτά τομάτας η καταπόνηση ξηρασίας προκάλεσε ανθεκτικότητα στο μύκητα *Botrytis cinerea* (Achu, et al., 2006).

1.3 Καταπόνηση από φυτοπαθογόνα βακτήρια

Ένα ευρύ φάσμα φυτοπαθογόνων βακτηρίων προσβάλλει πληθώρα καλλιεργούμενων ειδών, προκαλώντας σημαντικές απώλειες απόδοσης, καθώς η αντιμετώπιση τους δεν είναι εύκολα διαχειρίσιμη (Bach-Pages & Preston, 2018). Η ταξινόμηση των βακτηρίων έγκειται στις διαφορές τους σε μορφολογικά, γενετικά, βιοχημικά καθώς και φυτοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Σε επίπεδο ταξινόμησης των βακτηρίων, αξιοσημείωτη ήταν η συμβολή του Hans Christian Joachim Gram, ο οποίος ανέπτυξε την μέθοδο της «Χρώσης κατά Gram» το 1884. Πρόκειται για μία μέθοδο κατά την οποία τα βακτήρια κατηγοριοποιούνται με βάση τη χημική σύσταση του κυτταρικού τους τοιχώματος σε «αρνητικά κατά Gram» ή «θετικά κατά Gram». Μετέπειτα μελέτες κατέδειξαν ότι η πλειονότητα των ειδών των φυτοπαθογόνων βακτηρίων είναι «αρνητικά κατά Gram». Ωστόσο, καθώς τα είδη αυτά παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση ως προς το είδος των φυτών που προσβάλλουν καθώς και τη συμπτωματολογία που είναι ικανά να προκαλέσουν, σε κάθε είδος υπάρχουν οι παθότυποι (pathovars) και οι φυλές (races) (Τζάμος, 2017).

Τα φυτοπαθογόνα βακτήρια έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν είτε για σύντομο είτε για μεγάλο χρονικό διάστημα τόσο επιφυτικά -στις φυτικές επιφάνειες- όσο και σαπροφυτικά (Leonard, et al., 2017). Πολλαπλασιάζονται με απλή διχοτόμηση, ενώ οι βέλτιστες συνθήκες για την αναπαραγωγή και παθογένειά τους αφορούν σε θερμοκρασία ~25 °C και υγρασία ~80 %. Η προσβολή ενός φυτικού οργανισμού από ένα φυτοπαθογόνο βακτήριο ξεκινά από πληγές που προκαλούνται από μορφολογικούς παράγοντες, όπως οι φυσικές πηγές εισόδου (στομάτια), ή ακόμη και μηχανικούς παράγοντες, όπως η επίδραση του ανέμου. Η είσοδος των βακτηρίων είναι παθητική και υπό την επικράτηση ευνοϊκών κλιματικών συνθηκών δύναται να προκαλέσει μόλυνση, υπό την προϋπόθεση ότι τα βακτήρια διαθέτουν μια σειρά βιοχημικών παραγόντων που προσδίδουν παθογόνο δράση (Τζάμος, 2017).

Από το σύνολο των φυτοπαθογόνων βακτηρίων που απαντώνται στη φύση, ένα μόνο μικρό ποσοστό είναι ικανό να προκαλέσει ασθένειες στα φυτά, γεγονός που αποδίδεται στους εγγενείς μηχανισμούς άμυνας των φυτών (Han, 2018). Τα κυριότερα

γέννη των φυτοπαθογόνων βακτηρίων αναπτύσσονται μεταξύ των φυτικών κυττάρων - στον αποπλάστη- (Jones & Dangl, 2006) και προκαλούν ένα εύρος επιπτώσεων που εξειδικεύονται σε επίπεδο αλληλεπίδρασης φυτού-βακτηρίου:

- Agrobacterium: εμφανίζει μεγάλο εύρος ξενιστών και δημιουργεί υπερπλασίες με αποτέλεσμα το σχηματισμό όγκων λόγω ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού.
- Erwinia: δημιουργεί σε φυτικά όργανα μικρής ή μεγάλης έκτασης νεκρώσεις, έλκη, κηλιδώσεις στα φύλλα και σήψεις. Ακόμη, μπορεί να προκαλέσει αδροβακτηριώσεις, δηλαδή συμπτώματα μααρασμού, ημιπληγίας, αποπληξίας, νανισμού καθώς και μεταχρωματισμό των εσωτερικών ιστών.
- Pseudomonas: προκαλεί έλκη, κηλιδώσεις, νεκρώσεις φύλλων, υπερπλασίες καθώς και σήψεις.
- Xanthomonas: δημιουργεί κηλιδώσεις, έλκη και σήψεις σε μεγάλο εύρος ξενιστών.
- Ralstonia: προκαλεί συμπτώματα μααρασμού, χλώρωση φυλλώματος, νανισμό και μεταχρωματισμό των εσωτερικών ιστών (κυρίως των ριζών).

1.4 Μηχανισμοί άμυνας των φυτών έναντι καταπονήσεων

Με δεδομένη την αδυναμία φυγής υπό την επικράτηση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, τα φυτά έχουν αναπτύξει στρατηγικές που αποβλέπουν στην προσαρμογή και επιβίωσή τους (Dangl & Jones, 2001). Με τον όρο στρατηγική νοείται μια σειρά αποκρίσεων, οι οποίες ελέγχονται γενετικά και προσδίδουν τη δυνατότητα ανάπτυξης σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα. Στο πλαίσιο αυτό, το οπλοστάσιο των φυτών διαθέτει τρεις κύριες στρατηγικές άμυνας έναντι καταπονήσεων:

- Στρατηγική της διαφυγής: επιλέγεται από ετήσια φυτά τα οποία ολοκληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο κατά το χρονικό διάστημα όπου οι συνθήκες είναι επιθυμητές, χωρίς να επηρεάζονται από τον παράγοντα καταπόνησης. Παράδειγμα αποτελεί η ομάδα των θεροφύτων (therophyte) τα οποία διανύουν το διάστημα επικράτησης δυσμενών συνθηκών υπό μορφή σπερμάτων (Sarris & Koutsias, 2014).

- Στρατηγική της αποφυγής: τα φυτά που αξιοποιούν την εν λόγω στρατηγική αποφεύγουν τις επιπτώσεις του παράγοντα ή των παραγόντων καταπόνησης. Ως χαρακτηριστικό παράδειγμα αναφέρεται η ανάπτυξη ριζικού συστήματος που καθιστά εφικτή την άντληση ύδατος από τον υδροφόρο ορίζοντα υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης (Zhang, et al., 2020).
- Στρατηγική της ανθεκτικότητας: παρουσία ενός ή περισσότερων παραγόντων καταπόνησης, τα φυτά δεν υφίστανται κάποια βλάβη, καθώς διαθέτουν μηχανισμούς αντιστάθμισης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα γλυκόφυτα, τα οποία εμφανίζουν προηγμένη ανοχή στην καταπόνηση αλατότητας, αποκλείοντας συγκεντρώσεις Na^+ από τα φύλλα και διατηρώντας έτσι τη συγκέντρωση ιόντων Na^+ σε μη τοξικά επίπεδα (Munns & Tester, 2008).

Η επιλογή της εκάστοτε στρατηγικής από μέρους των φυτών υλοποιείται μέσω αποκρίσεων προσαρμογής (adaptation) και εγκλιματισμού (acclimation) με παράλληλη τροποποίηση των δομών και των λειτουργιών του. Η προσαρμογή αναφέρεται στην ικανότητα αυτή των φυτών να αντιλαμβάνονται τα περιβαλλοντικά σήματα, να τροποποιούνται μορφολογικά και λειτουργικά και να προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες του περιβάλλοντος (Taiz & Zeiger, 2002). Αντίθετα, ο εγκλιματισμός αναφέρεται σε επίκτητες τροποποιήσεις λειτουργιών που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου των φυτών προκειμένου να ανταπεξέλθουν στην εκάστοτε καταπόνηση (Καραμπουρνιώτης, κ.α., 2012).

Σημαντικό ρόλο βέβαια παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά του φυτικού οργανισμού κατά τη διάρκεια προσαρμογής και εγκλιματισμού του. Πέραν της γονοτυπικής εξάρτησης, σημαντικότερη επίδραση ασκεί και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Συνεπώς, είτε σε επίπεδο είδους είτε σε επίπεδο γονοτύπου του ίδιου είδους, ένα φυτό δύναται να εμφανίζει ευαισθησία σε έναν παράγοντα καταπόνησης σε ένα συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης, ενώ σε άλλο αναπτυξιακό στάδιο να εμφανίζει ανοχή στην ίδια καταπόνηση.

Οι περίπλοκοι μηχανισμοί που αξιοποιούν τα φυτά, μεταξύ άλλων, βασίζονται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά καθώς και σε βιοχημικές ουσίες που συντίθεται προκειμένου να αντιμετωπίσουν την προσβολή από παθογόνα και την πρόκληση ασθένειας (Bari & Jones, 2008). Οι μηχανισμοί άμυνας διακρίνονται σε προϋπάρχοντες ή αλλιώς δομικούς μηχανισμούς και σε επαγόμενους. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός

ότι στους προϋπάρχοντες μηχανισμούς η άμυνα είναι ενεργοποιημένη σε δομικό επίπεδο ανεξάρτητα από τυχόν προσβολή, ενώ στους επαγόμενους μηχανισμούς η άμυνα ενεργοποιείται έπειτα από το ερέθισμα της προσβολής, δηλαδή σε περίπτωση σήματος κινδύνου (Kant, et al., 2015).

Οι δομικοί ή προϋπάρχοντες μηχανισμοί περιλαμβάνουν ένα σύνολο φυσικών και χημικών γνωρισμάτων, όπως η ύπαρξη κυρών, το πάχος της εφυμενίδας, η σκληρότητα και η διάμετρος των κυτταρικών τοιχωμάτων, η δραστηριότητα των στοματίων, η κατασκευή της ενδοδερμίδας, η λειτουργία των νευρώσεων των φύλλων, τα επιφανειακά τριχίδια, η παρουσία θρεπτικών συστατικών καθώς και τοξικών μεταβολιτών και ενζύμων με αντιμικροβιακή δράση (Τζάμος, 2017).

Οι επαγόμενοι μηχανισμοί αφορούν σε ένα σύνολο ιστολογικών και βιοχημικών αποκρίσεων, στις οποίες συγκαταλέγονται η εναπόθεση λιγνίνης και καλλόξης καθώς και οι θύλακες λιγνίνης, η δημιουργία τυλώσεων ή θηλίδων και στρωμάτων φελλών, η παραγωγή ενζύμων υδρόλησης και οξείδωσης, η σύνθεση ενεργών μορφών οξυγόνου και τέλος, η βιοσύνθεση φυτοαλεξίνων. Ειδικά για τις φυτοαλεξίνες, έχει διαπιστωθεί ότι αποτελούν έναν σπουδαίο βιοχημικό μηχανισμό αντοχής των φυτών, γεγονός που απορρέει από την αυξημένη συσσώρευσή τους σε ανθεκτικούς γονοτύπους συγκριτικά με τους ευαίσθητους (Ahuja, et al., 2012). Η επαγωγή μέρους ή του συνόλου των επαγόμενων μηχανισμών άμυνας έχει βάση τις αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται με ανθεκτικά φυτά και συνδέεται άμεσα με την αντίδραση υπερευαισθησίας (Ταμπακάκη, 1999).

1.4.1 Αντίδραση Υπερευαισθησίας

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και παθογόνων οργανισμών περιλαμβάνουν ένα μεγάλο εύρος αποκρίσεων που εκτείνονται από την πλήρη καταστολή της βασικής άμυνας των φυτών έως και τη δραστική καταστολή του παθογόνου, μέσω μίας γραμμής άμυνας των φυτών, την Αντίδραση Υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response-HR). Η έννοια της αντίδρασης υπερευαισθησίας διατυπώθηκε πρώτη φορά το 1915 από τον Stackman ως η ταχύτατη νέκρωση των κυττάρων σε ποικιλίες σιτηρών, ανθεκτικών στους μύκητες που προκαλούν σκωριάσεις (Τζάμος, 2017). Ουσιαστικά, η HR είναι ένας προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που εκδηλώνεται ως αντοχή των φυτών έναντι ενός παθογόνου. Εν προκειμένω, το παθογόνο κατά την προσπάθεια εδραίωσης

της μόλυνσης εγκλωβίζεται, καθώς ο φυτικός οργανισμός δημιουργεί μια τοπική ιστολογική νέκρωση στο σημείο εισόδου του παθογόνου, η οποία πρακτικά καταστέλλει τη μόλυνση.

Η HR είναι μία ευρέως διαδεδομένη αντίδραση που απαντάται στην πλειοψηφία των φυτών έπειτα από μόλυνση με παθογόνα όπως μύκητες, βακτήρια, νηματώδεις, ιούς ακόμα και έντομα (Balint-Kurti, 2019). Θεωρείται ως μια βιοχημική διεργασία άμυνας, παρά ως δομική διεργασία, η οποία είναι μακροσκοπικά ορατή (Agrios, 2005) (Εικόνα 1.4). Η HR παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το φαινόμενο της απόπτωσης, το οποίο απαντάται στα θηλαστικά και ορισμένα φυτικά είδη και οφείλεται κυρίως στη δομή του DNA. Εντούτοις, δεν έχουν γίνει εκτεταμένες έρευνες για τα βιοχημικά μονοπάτια ελέγχου των εν λόγω φαινομένων (Chakraborty, et al., 2017).



Εικόνα 1.4: Αντίδραση Υπερευαισθησίας σε φύλλο του είδους *Arabidopsis thaliana* (Πηγή: Freeman & Beattie, 2008).

Παράλληλα, έχει διαπιστωθεί ότι η HR ακολουθείται από μία κατάσταση διασυστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας (Systemic Acquired Resistance-SAR), μια μορφή αντίστασης του φυτού που παρατηρείται σε υγιείς ιστούς έπειτα από τοπική μόλυνση (Mak & Saunders, 2006). Αποτέλεσμα αυτής της ακολουθίας είναι η ικανότητα του φυτού να αντισταθεί στην επικείμενη μόλυνση από ένα ευρύ φάσμα παθογόνων.

1.5 Βελτίωση φυτών και ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων

Στις προσπάθειες της βελτίωσης της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων σημαντική είναι η συμβολή τόσο της Κλασικής Βελτίωσης όσο και της Μοριακής Βελτίωσης. Η Κλασική Βελτίωση περιλαμβάνει σχήματα επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων καθώς και σχήματα υβριδισμού μεταξύ διαφορετικών γονοτύπων, ακολουθούμενα από επιλογή επιθυμητών γονοτύπων σε διαχωριζόμενους πληθυσμούς. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι διαδικασίες Κλασικής Βελτίωσης έχουν μέχρι σήμερα οδηγήσει στη δημιουργία πληθώρας ποικιλιών που χαρακτηρίζονται από γενετική ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων (Ρουπακιάς, 2010).

Η Μοριακή Βελτίωση αξιοποιεί τις σύγχρονες μοριακές προσεγγίσεις, συμπληρώνοντας τις συμβατικές βελτιωτικές μεθόδους, στο πλαίσιο δημιουργίας ποικιλιών που εμφανίζουν ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων καθώς και άλλα επιθυμητά γνωρίσματα. Ως προς τις μοριακές προσεγγίσεις, κομβική υπήρξε η συμβολή της ανακάλυψης της αλυσιδωτής αντίδρασης τη πολυμεράσης (Polymerase chain reaction-PCR) το 1984 από τον Αμερικάνο Kary Mullis καθώς και των περιοριστικών ενζύμων το 1950. Οι ανωτέρω ανακαλύψεις προσέφεραν τη δυνατότητα ευχερούς χειρισμού του γενετικού υλικού, γεγονός που αξιοποιήθηκε ευρέως στην επιστήμη της βελτίωσης των φυτών. Η Μοριακή Βελτίωση περιλαμβάνει δύο κύριες κατηγορίες εφαρμογών. Η πρώτη αφορά στη χρήση των μοριακών δεικτών, δηλαδή συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA που μπορούν να ανιχνευθούν με μοριακές αναλύσεις, και εμφανίζουν γενετική παραλλακτικότητα σε επίπεδο ατόμων και πληθυσμών. Βασικές εφαρμογές στην εν λόγω κατηγορία αποτέλεσαν η γενετική ταυτοποίηση σε επίπεδο ατόμου, η εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας σε πληθυσμιακό επίπεδο (Russell, 2013) καθώς και η σήμανση και επιλογή επιθυμητών γνωρισμάτων, στο πλαίσιο της υποβοηθούμενης από μοριακούς δείκτες βελτίωσης.

Η δεύτερη κατηγορία αφορά στην τεχνολογία της Γενετικής Μηχανικής, η οποία χρονολογείται στο 1980. Ο όρος Γενετική Μηχανική ή γενετική τροποποίηση αναφέρεται στην απομόνωση ενός ή περισσότερων επιθυμητών γονιδίων (διαγονίδια) και στη μετέπειτα ενσωμάτωσή τους σε έναν οργανισμό (διαγονιδιακός), με σκοπό τη δημιουργία *de novo* γενετικής παραλλακτικότητας. Ωστόσο, υπάρχουν και περιπτώσεις όπου η Γενετική Μηχανική χρησιμοποιείται για αποσιωποποίηση ενός ανεπιθύμητου

γονιδίου. Η γένεση της Γενετικής Μηχανικής επέφερε σημαντικά πλεονεκτήματα τα οποία, μεταξύ άλλων, αφορούν σε (Vaishnav & Demain, 2009):

- Ανθεκτικότητα των φυτών έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα, σε ασθένειες, σε έντομα, στην ξηρασία).
- Αναβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των φυτών (περιεκτικότητα σακχάρων, πρωτεϊνών).
- Ανάπτυξη ποικιλιών φυτών με λειτουργικές ιδιότητες και βιοδραστικές ή/και φαρμακευτικές ουσίες (βιταμίνες, ίνες).
- Ανάπτυξη ποικιλιών φυτών με βελτιωμένα μορφολογικά γνωρίσματα, αυξημένη ποσότητα βιομάζας και αυξημένη απόδοση.

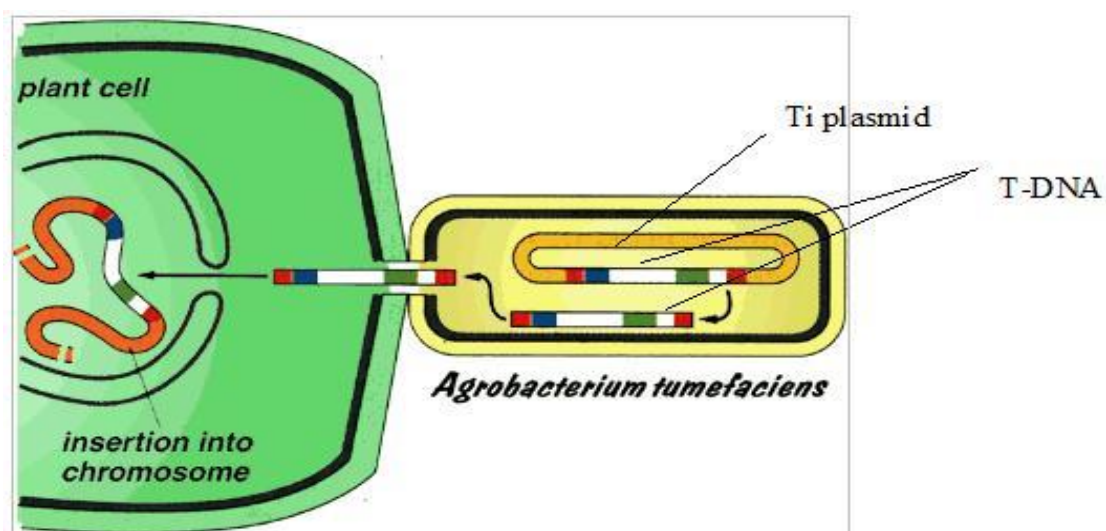
Η δομή του DNA είναι πανομοιότυπη σε όλους τους οργανισμούς, ωστόσο η διάταξη των βάσεων προσδίδει διαφορετικά χαρακτηριστικά σε κάθε έναν οργανισμό. Με την πρόοδο της Βιοτεχνολογίας έγινε δυνατή η απομόνωση γονιδίων, τα οποία μπορεί να είναι ζωικής, φυτικής, βακτηριακής ή ακόμα και ιικής προέλευσης και η ενσωμάτωσή τους στο γενετικό υλικό οποιουδήποτε οργανισμού. Στους φυτικούς οργανισμούς, η μεταφορά επιθυμητών γονιδίων μπορεί να γίνει απευθείας στο γονιδίωμα του φυτού (Wieczorek & Wright, 2012). Η Βιοτεχνολογία συμβάλλει στη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών, μέσω διαφορετικών μεθόδων, όπως η μεταφορά γονιδίων μέσω φορέα, η μεταφορά DNA με σωματιδιακούς φορείς και η άμεση μεταφορά DNA.

1.5.1 Μεταφορά γονιδίων μέσω του *Agrobacterium*

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο εδάφους το οποίο είναι υπεύθυνο για την ασθένεια του κορωνοτού κάλλου, δημιουργώντας όγκους στους φυτικούς οργανισμούς. Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ικανό μεταφοράς ενός μικρού κυκλικού μορίου DNA, το Ti πλασμίδιο (Ti plasmid), και το οποίο φέρει την προς ενσωμάτωση περιοχή που καλείται T-DNA. Το T-DNA με τη σειρά του, είναι ικανό να διαπερνά τον πυρήνα του φυτικού κυττάρου και να ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του με τρόπο που εξασφαλίζει τη σταθερή κληρονομήση από γενιά σε γενιά. Ο σχηματισμός όγκων είναι το τελικό αποτέλεσμα

μίας αλληλουχίας διεργασιών που περιλαμβάνουν τη μεταφορά, ενσωμάτωση και έκφραση γονιδίων.

Στο πλαίσιο αξιοποίησης της Γενετικής Μηχανικής, γίνεται τροποίηση των χρησιμοποιούμενων πλασμιδίων, η οποία αφορά σε απομάκρυνση των γονιδίων που επάγουν τη δημιουργία όγκων και παράλληλη αντικατάστασή τους με γονίδια που ελέγχουν επιθυμητά γνωρίσματα. Έπειτα από μόλυνση με το *Agrobacterium tumefaciens*, επιτυγχάνεται ενσωμάτωση του/των γονιδίου/ων ενδιαφέροντος στο γονιδίωμα του φυτικού οργανισμού προσδίδοντας επιθυμητά χαρακτηριστικά (Εικόνα 1.5). Η πρακτική αυτή φαίνεται ότι είναι αποτελεσματική κυρίως για φυτά, τα οποία είναι ξενιστές του *Agrobacterium tumefaciens* και βρίσκει εφαρμογή κυρίως σε δικοτυλήδονα είδη (Gelvin, 2003).



Εικόνα 1.5: Διαδικασία γενετικού μετασχηματισμού ενός φυτικού οργανισμού μέσω του *Agrobacterium tumefaciens*.

(Πηγή: <http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/SITEGRAPHICS/Agrotrans.GIF>).

1.5.2 Μεταφορά DNA με σωματιδιακούς φορείς

Η συγκεκριμένη μέθοδος περιλαμβάνει την επικάλυψη σωματιδίων χρυσού ή σπανιότερα βολφραμίου με DNA και επιτάχυνση των σωματιδίων αυτών προς το φυτικό ιστό. Τα σωματίδια διαπερνούν το τοίχωμα του φυτικού κυττάρου και κατά την επαφή με αυτό απελευθερώνουν το DNA, το οποίο ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του

φυτικού κυττάρου. Η βιολιστική έχει αναδειχθεί ως αποτελεσματική μέθοδος για την ενσωμάτωση γονιδίων ενδιαφέροντος σε ένα ευρύ φάσμα φυτικών οργανισμών (Ueki, et al., 2013).

1.5.3 Άμεση μεταφορά DNA

Η ηλεκτροπόρωση είναι μία μέθοδος άμεσης μεταφοράς DNA, κατά την οποία η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί διηλεκτρική βλάβη στη μεμβράνη του κυττάρου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεμβρανικών πόρων οι οποίοι στη συνέχεια κλείνουν. Κατά αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται διάχυση του DNA στο φυτικό ιστό μέσω των πόρων και η ενσωμάτωση επιθυμητών γονιδίων. Η μέθοδος της ηλεκτροπόρωσης είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική όταν πραγματοποιείται μετασχηματισμός πρωτοπλαστών (Wu & Feng, 1999).

1.6 Προσεγγίσεις της Γενετικής Μηχανικής στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων

Οι τεχνολογίες της Γενετικής Μηχανικής, που περιλαμβάνουν την εύρεση, απομόνωση και μεταφορά γονιδίων ανεξαρτήτως προέλευσης και ταξινομικών εμποδίων, συνέβαλαν καταλυτικά στην αναβάθμιση των βελτιωτικών διαδικασιών, εγείροντας ωστόσο θέματα που σχετίζονται με τη βιοηθική.

Στο πλαίσιο αξιοποίησης της γενετικής μηχανικής στη βελτίωση των φυτών, βασικό ερευνητικό πεδίο αποτέλεσε η αναβάθμιση της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι καταπονήσεων. Το ενδιαφέρον προς την ενίσχυση του βιοχημικού οπλοστασίου των φυτών αυτό οδήγησε στην ανακάλυψη και αξιοποίηση διαφορετικών προσεγγίσεων για την επίτευξη προηγμένης άμυνας. Στοχεύοντας στην επίτευξη ανθεκτικότητας, βασικές στρατηγικές αποτελούν: i) η αξιοποίηση γονιδίων που προέρχονται από παθογόνα και είναι ικανά να προσδώσουν ανθεκτικότητα (Pathogen Derived Resistance-PDR), ii) η ενσωμάτωση στο φυτικό γονιδίωμα αντισωμάτων (Plantibodies) καθώς και iii) η αξιοποίηση του μηχανισμού γονιδιακής σίγησης (Gene silencing) (Prins, et al., 2008).

1.6.1 Ανθεκτικότητα που προέρχεται από παθογόνα

Η σύλληψη για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας αξιοποιώντας γονίδια και γονιδιακά προϊόντα που προέρχονται από παθογόνα (Pathogen Derived Resistance-PDR), προτάθηκε πρώτη φορά από τους Sanford και Johnston το 1985. Η στρατηγική αυτή περιλαμβάνει την απομόνωση ενός γονιδίου από ένα παθογόνο και την ενσωμάτωσή του στο φυτικό γονιδίωμα με τη χρήση της Γενετικής Μηχανικής. Η ενδογενής έκφραση του γονιδίου που προέρχεται από το παθογόνο οδηγεί τελικά σε αδυναμία παθογένεσης (Sanford & Johnston, 1985). Συνηθέστερη στρατηγική επίτευξης ανθεκτικότητας αποτελεί η έκφραση των γονιδιακών προϊόντων του παθογόνου σε περίσσεια ή σε μη επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης ή ακόμα και σε δυσλειτουργική μορφή. Κατά αυτόν τον τρόπο, η ετερόλογη έκφρασή τους διαταράσσει τη φυσιολογική διαδικασία μόλυνσης του παθογόνου, ενώ η επίδραση στον ξενιστή είναι ελάχιστη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η μέθοδος αυτή συνέβαλε στην κατανόηση και επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι ασθενειών που προκαλούνται από ιούς (Lomonossoff, 1995). Προς την κατεύθυνση αυτή, πραγματοποιείται ενσωμάτωση στο φυτικό γονιδίωμα γονιδίων που προέρχονται από ιούς, όπως ρεπλικάσες, πρωτεΐνες κίνησης και κάλυψης, καθώς και μη μεταφρασμένα τμήματα RNA (Beachy, 1997).

1.6.2 Γονιδιακή Σίγηση

Η γονιδιακή σίγηση (Gene Silencing), αποτελεί έναν μηχανισμό προστασίας των φυτών που παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με την ανθεκτικότητα που προέρχεται από παθογόνα. Ο όρος γονιδιακή σίγηση περιγράφει την παρουσία, στον ίδιο χρόνο και τόπο, ομόλογων μορίων, που έχει σαν αποτέλεσμα την αποδόμηση τους. Η ενεργοποίηση του μηχανισμού γονιδιακής σίγησης προϋποθέτει την ενσωμάτωση μιας αλληλουχίας ιικής προέλευσης, υπό τη μορφή δίκλωνου RNA (dsRNA) μορίου, στο φυτικό γονιδίωμα, η οποία επάγει μία σειρά αντιδράσεων που περιλαμβάνουν την αναγνώριση ομόλογων αλληλουχιών και τη μετέπειτα αποδόμησή τους σε μικρά RNA μόρια (siRNAs) (English, et al., 1996). Η γονιδιακή σίγηση είναι ως επί το πλείστον αποτελεσματική στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ρυθμίζοντας την έκφραση ενός ενδογενούς γονιδίου σε μεταγραφικό ή μετα-μεταγραφικό στάδιο (Vaucheret, et al., 1998). Απαντάται και στα τέσσερα ευκαρυωτικά βασίλεια, δηλαδή στα πρώτιστα,

στους μύκητες, στα φυτά και στα ζώα. Στα φυτά αναφέρεται ως “RNA silencing” (Baulcombe, 2004), στους μύκητες ως “quelling” (Cogoni & Macino, 1999) ενώ στα ζώα ως “RNA interference” (RNAi) (Fire, et.al., 1998). Η εφαρμογή της γονιδιακής σίγησης, μπορεί να συμβάλλει στην προηγμένη απόκριση των φυτών έναντι παθογόνων, χωρίς να επηρεάζεται η ομαλή ανάπτυξη των φυτών. Με δεδομένη την αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητά της, η εν λόγω προσέγγιση θεωρείται μείζονος σημασίας για την επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι ασθενειών.

1.6.3 Αντισώματα

Οι φυτικοί οργανισμοί δε διαθέτουν αντισώματα, καθώς στερούνται ανοσοποιητικού συστήματος. Ωστόσο, η εισαγωγή ετερόλογων αντισωμάτων, έχει αποδειχθεί ότι δύναται να επάγει ανθεκτικότητα, παρά το γεγονός ότι δεν είναι εξειδικευμένο αντίσωμα για το συγκεκριμένο παθογόνο. Σύμφωνα με αποτελέσματα ερευνών, γενετικά τροποποιημένα φυτά που εκφράζουν αντισώματα είναι ικανά να προσλάβουν αντισώματα έναντι καψιδιακών πρωτεϊνών διαφόρων ιών. Η πρώτη βάσιμη διαπίστωση για την αποτελεσματικότητα έκφρασης αντισωμάτων προέκυψε από την μειωμένη ευαισθησία διαγονιδιακών φυτών έναντι του ιού της κατσαρής ποικιλοχλώρωσης της αγκινάρας (*Artichoke mottle crinkle virus-AMCV*). Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα σε φυτά που εκφράζουν αντισώματα έναντι της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού (Jaeger, et al., 2000). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν σε διαγονιδιακά φυτά καπνού, τα οποία εμφάνισαν ανθεκτικότητα ενάντια στον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus-TMV*) (Zimmermann, et al., 1998). Παρά το γεγονός ότι η εν λόγω προσέγγιση δεν έχει αξιοποιηθεί ευρέως εκτιμάται ότι η ενσωμάτωση αντισωμάτων σε φυτά μπορεί να αποτελέσει μία αποτελεσματική μέθοδο για την επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι παθογόνων στοχεύοντας σε διαφορετικής φύσης πρωτεΐνες, όπως οι πρωτεΐνες κίνησης και οι ρεπλικάσες των ιών καθώς και τα ένζυμα βακτηρίων και μυκήτων. Η συγκεκριμένη στρατηγική απαιτεί την ενσωμάτωση ολόκληρων ή θραυσμάτων αντισωμάτων σε φυτά μέσω βιοτεχνολογικών μεθόδων (Ko & Stepkowski, 2009).

1.7 Γονίδια που προέρχονται από φυτοπαθογόνα βακτήρια

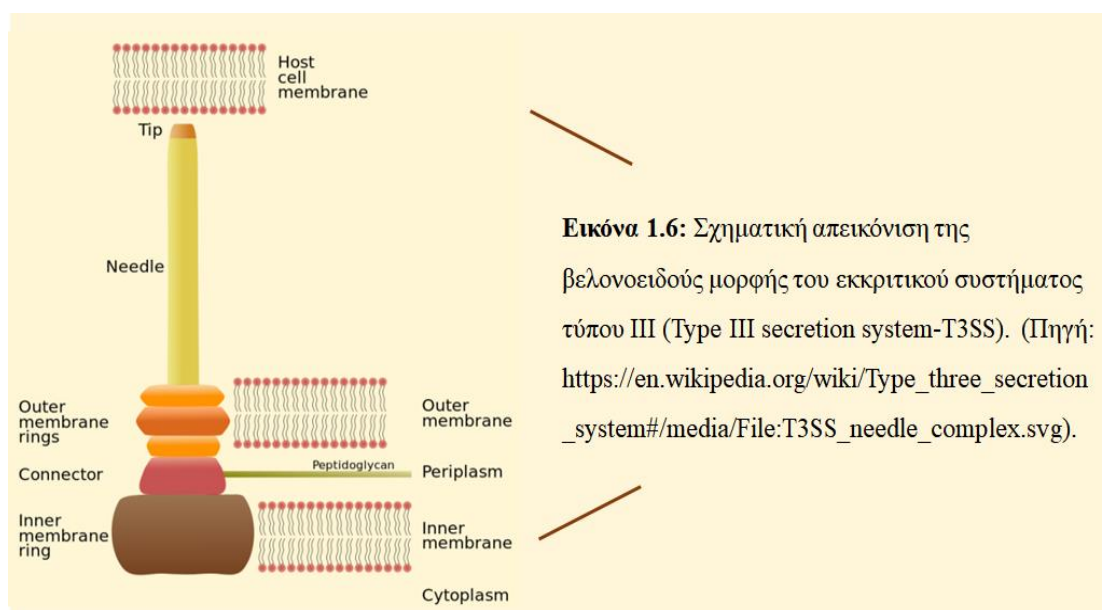
Τα τελευταία χρόνια, η συστηματική μελέτη της αλληλεπίδρασης διαφόρων συστημάτων φυτών-παθογόνων συνέβαλε καθοριστικά στην κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τόσο την παθογένεια όσο και την εκδήλωση ανθεκτικότητας σε ανθεκτικούς γονοτύπους. Παράλληλα, η μελέτη των εν λόγω αλληλεπιδράσεων επέτρεψε την αναγνώριση γονιδίων ανθεκτικότητας (R genes) των φυτών αλλά και διαφόρων πρωτεϊνών-τελεστών που προέρχονται από παθογόνα (Jones & Dangl, 2006).

Κατά τη διάρκεια της συνεξέλιξης φυτών και ξενιστών παθογόνων, τα φυτά έχουν αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας ώστε να αντιμετωπίζουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς και να καθίσταται εφικτή η ανάπτυξη και επιβίωσή τους υπό συνθήκες ασθένειας. Οι μηχανισμοί άμυνας των φυτών διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τη βασική ή πρώτη γραμμή άμυνας (pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity, PTI) (Monaghan and Zipfel, 2012) και ii) την επαγόμενη από τελεστές άμυνα ή δεύτερη γραμμή άμυνας (effector triggered immunity, ETI) (Eitas and Dangl, 2010). Η βασική γραμμή άμυνας αφορά στην κατοχή των φυτών συγκεκριμένων μεμβρανικών υποδοχέων (pattern recognition receptors, PRRs) που αναγνωρίζουν την εισβολή μέσω της αναγνώρισης μοριακών στοιχείων του παθογόνου (Monaghan and Zipfel, 2012). Ως απόκριση στη βασική άμυνα των φυτών, τα παθογόνα έχουν αναπτύξει τους τελεστές (effectors), οι οποίοι δρουν ως παράγοντες παθογένειας, με αποτέλεσμα τα φυτά να ενεργοποιούν τη δεύτερη γραμμή άμυνας. Η τελευταία, συχνά περιλαμβάνει την επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας.

Οι πρωτεΐνες-τελεστές (effectors proteins) είναι γονίδια τα οποία εκκρίνονται από παθογόνα ή συμβιωτικά βακτήρια και εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή (Hewezi & Baum, 2013). Ο ρόλος των τελεστών είναι διττός. Στα μεν βακτήρια εξυπηρετούν, δρώντας ως παράγοντες μολυσματικότητας σε γονοτύπους που εμφανίζουν ευαισθησία στο αντίστοιχο παθογόνο, μεταβάλλοντας το μεταβολισμό και το αμυντικό σύστημα του ξενιστή. Στους ανθεκτικούς γονοτύπους των φυτών ξενιστών ή σε φυτά μη ξενιστές, οι τελεστές αλληλεπιδρούν με το φυτό, δρώντας ως παράγοντες αμολυσματικότητας, και οδηγώντας συχνά στην επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Slot & Knogge, 2010). Έχει διαπιστωθεί ότι οι πρωτεΐνες-τελεστές μεταφέρονται από το βακτηριακό στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα, ενώ το εύρος

ξενιστών ενός παθογόνου καθορίζεται από την παρουσία κατάλληλων πρωτεϊνών-τελεστών που επιτρέπουν τον αποικισμό του (Dodds & Rathjen, 2010). Είναι προφανές ότι τα γονίδια αυτά που προέρχονται από φυτοπαθογόνα βακτήρια μπορούν να συμβάλλουν στην περαιτέρω κατανόηση της λειτουργίας των ξενιστών ενάντια στα παθογόνα.

Τα βακτήρια είναι ικανά να εισάγουν ελάχιστες ή ακόμα και εκατοντάδες πρωτεΐνες-τελεστές στα κύτταρα των ξενιστών τους, μέσω των συστημάτων έκκρισης πρωτεϊνών που διαθέτουν. Τα εκκριτικά συστήματα των βακτηρίων ονομάζονται τύπου I, II, III, IV, V και VI. Η πλειονότητα των φυτοπαθογόνων βακτηρίων εισάγουν τις πρωτεΐνες τους στους φυτικούς οργανισμούς μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III (Type III secretion system, T3SS) (Lindeberg, et al., 2012). Το T3SS απαντάται σε αρνητικά κατά Gram και ευθύνεται για την έκκριση ή/και μεταφορά πρωτεϊνών απευθείας από το βακτηριακό στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα (Coburn & Finlay, 2007). Το T3SS είναι ένα σύνθετο σύστημα με χαρακτηριστικά μιας πρωτεϊνικής υπερδομής που δομείται από 20-25 πρωτεΐνες και εδράζεται στο βακτηριακό κυτταρικό φάκελο, εξυπηρετώντας την παθογένεια, εγχύοντας τις βακτηριακές πρωτεΐνες έπειτα από την επαφή του βακτηρίου με το κύτταρο του ξενιστή (Puhar & Sansonetti, 2014) (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6: Σχηματική απεικόνιση της βελονοειδούς μορφής του εκκριτικού συστήματος τύπου III (Type III secretion system-T3SS). (Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Type_three_secretion_system#/media/File:T3SS_needle_complex.svg).

Η παρουσία των τελεστών είναι καίριας σημασίας στην παθογένεια. Η απουσία του T3SS, το οποίο δεν είναι απαραίτητο για την επιβίωση, δεν καθιστά εφικτή την πρόκληση ασθενειών από βακτήρια σε φυτά ξενιστές, καθώς ούτε και την πρόκληση αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά μη ξενιστές (Alfano & Collmer, 2004). Το T3SS μπορεί να συμβάλλει στην αντιμετώπιση των «αρνητικών κατά Gram» παθογόνων βακτηρίων, δεδομένου ότι είναι εύκολα προσβάσιμο σε μικρά μόρια τα οποία μπορούν να μπλοκάρουν τη μολυσματικότητα χωρίς να διασχίζουν βακτηριακές μεμβράνες (Lombardi, et al., 2019).

1.8 Τα γονίδια *hpaA* και *hpaB*

Στο γένος *Xanthomonas* ανήκουν αρνητικά κατά Gram φυτοπαθογόνα βακτήρια που προκαλούν ασθένειες σε πληθώρα καλλιεργούμενων ειδών ξενιστών. Τα εν λόγω βακτήρια αξιοποιούν το σύστημα έκκρισης τύπου III για την έγχυση πρωτεϊνών-τελεστών στο φυτικό κύτταρο, των οποίων η δράση σχετίζεται είτε με την προαγωγή των συμπτωμάτων της ασθένειας είτε με την εκδήλωση ανθεκτικότητας. Οι τελεστές τύπου III μπορούν να ομαδοποιηθούν σε διαφορετικές οικογένειες με βάση την αλληλουχία τους και τη βιοχημική τους δράση.

Τα διαφορετικά είδη και παθότυποι (pathovars-pv) που ανήκουν στο γένος *Xanthomonas* διαφοροποιούνται ως προς την κατοχή πρωτεϊνών-τελεστών. Αναφορικά με το γονίδιο *hpaA*, έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ένα συντηρημένο γονίδιο που απαντάται σε διαφορετικά είδη *Xanthomonas* spp. (Lorenz, et al., 2008), συμπεριλαμβανομένου του *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Κατ' αναλογία, το γονίδιο *hpaB* απαντάται στο βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, αλλά εντοπίζεται και σε άλλα είδη, όπως τα *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *glycines* και *X. campestris* pv. *campestris* (Büttner, et.al., 2004). Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, το γονίδιο *hpaA* δρα ως τελεστής καθώς προκαλεί παθογένεια, προάγοντας την ανάπτυξη συμπτωμάτων ασθένειας σε ευαίσθητα φυτά, ενώ παράλληλα επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας σε ανθεκτικούς γονοτύπους και φυτά μη ξενιστές. Αναφορικά με το γονίδιο *hpaB*, έχει αναδειχθεί ότι η παρουσία του είναι καταλυτικής σημασίας για την παθογένεια του βακτηριακού φορέα του, ειδάλλως δεν μπορεί να προκληθεί ολοκληρωτική παθογένεια (Lonjon, et al., 2017). Επιπλέον, έρευνες ανέδειξαν την

ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών HraA και HraB, και ειδικότερα αποδείχθηκε ότι η έκκριση των πρωτεϊνών μη τελεστών προϋποθέτει την πρόσδεση του γονιδίου *hraA* στο *hraB*. Αντίστροφα, η έκκριση των πρωτεϊνών-τελεστών προϋποθέτει την απελευθέρωση του γονιδίου *hraB*. Σύμφωνα με μελέτες σχετικά με την δράση των γονιδίων *hraA* και *hraB* στους βακτηριακούς φορείς τους, έχει προταθεί ότι το γονίδιο *hraA* δρα ως ρυθμιστής του εκκριτικού συστήματος τύπου III (Lorenz, et al., 2008), ενώ για το *hraB* έχει προταθεί ότι δρα ως μία ρυθμιστική πρωτεΐνη εξόδου στο εκκριτικό σύστημα τύπου III (Buttner, et al., 2004). Σε κάθε περίπτωση, η συντήρηση των γονιδίων *hraA* και *hraB* στα είδη *Xanthomonas spp.* υπογραμμίζει τον καίριο ρόλο τους στην παθογένεια των βακτηριακών τους φορέων.

1.9 Το φυτό-μοντέλο *Nicotiana benthamiana*

Το *Nicotiana benthamiana* είναι ένα άγριο είδος καπνού με Αυστραλιανή καταγωγή. Κατατάσσεται στα Αγγειόσπερμα της οικογένειας Solanaceae και διαθέτει $n = 19$ ζεύγη χρωμοσωμάτων και ένα περίπλοκο γονιδίωμα μήκους ~3,136 Mbp. Σήμερα αποτελεί, μαζί με το *Arabidopsis thaliana*, ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα φυτά-μοντέλα στις μελέτες αλληλεπίδρασης φυτών-παθογόνων, και δη αλληλεπίδρασης φυτών-ιών, γεγονός που εν μέρει έγκειται στο μεγάλο εύρος παθογόνων που προσβάλλουν το συγκεκριμένο είδος. Σημαντικό πλεονέκτημα επίσης αποτελεί ο σύντομος βιολογικός κύκλος (Goulet, et al., 2019).

Επιπλέον, ιδιαίτερη σημασία δίνεται στη διαθεσιμότητα πληθώρας πρωτοκόλλων γενετικού μετασχηματισμού του συγκεκριμένου είδους, τα οποία επιτρέπουν την ευχερή και ταχεία ανάπτυξη διαγονιδιακών σειρών προς αξιοποίηση σε έρευνες. Στο πλαίσιο αυτό, η γενετική τροποποίηση του είδους μπορεί να επιτευχθεί μέσω του ευρέως χρησιμοποιούμενου βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch, et al., 1985) καθώς και με τη χρήση της μεθόδου του αγροεμποτισμού (agroinfiltration), η οποία αφορά στον εμποτισμό της φυλλικής επιφάνειας με βακτηριακά ή ιικά κύτταρα του φορέα με στόχο την παροδική έκφραση διαγονιδίων (Goodin, et al, 2007).

Τέλος, σημαντικό πλεονέκτημα του είδους *Nicotiana benthamiana* αποτελεί το γεγονός ότι προσφέρει τη δυνατότητα μελέτης της γονιδιακής λειτουργίας που επάγεται από μηχανισμούς γονιδιακής σίγησης (Bally, et al., 2018). Απόρροια των ανωτέρω είναι η ευρεία χρήση του *Nicotiana benthamiana* σε πλήθος ερευνών, παρά τις ελλείψεις

πληροφορίες που υπάρχουν σχετικά με το γονιδίωμα, την καταγωγή και τη γενετική ποικιλομορφία του φυτού, που ακόμα και σήμερα αποτελούν αντικείμενο μελέτης.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η διττή φύση των πρωτεϊνών-τελεστών (effectors) στην παθογένεια και την αμολυσματικότητα, με κύρια λειτουργία ωστόσο την πρόκληση συμπτωμάτων, έχει στρέψει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας προς τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών-τελεστών και πρωτεϊνών των φυτών. Απώτερο σκοπό αποτελεί η αξιοποίηση της σχετικής γνώσης για την αναβάθμιση της ανθεκτικότητας έναντι παραγόντων καταπόνησης. Οι πρωτεΐνες-τελεστές που προέρχονται από φυτοπαθογόνα βακτήρια εκκρίνονται στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων, μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III (T3SS), συνεισφέροντας έτσι στην επαγόμενη απόκριση των φυτών. Το γονίδιο *hpaB*, που εμφανίζει υψηλή συντήρηση στο γένος *Xanthomonas*, έχει αποδειχθεί ότι εξυπηρετεί την παθογόνο ικανότητα του βακτηριακού του φορέα, συμβάλλοντας στην έκκριση πρωτεϊνών μέσω του T3SS. Με δεδομένο ότι η δράση του *hpaB* σε φυτά δεν έχει διερευνηθεί, στόχο της διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hpaB*, από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* ως προς την ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών καταπονήσεων. Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε συγκριτικά η απόκριση διαγονιδιακών *hpaB*-σειρών και φυτών αγρίου τύπου στη μόλυνση με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των διαγονιδιακών φυτών έγινε βάσει της συμπτωματολογίας, της αποίκισης του βακτηρίου και της περιεχόμενης ποσότητας χλωροφύλλης πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, αποτέλεσαν διαγονιδιακές σειρές του είδους *Nicotiana benthamiana*, οι οποίες φέρουν το γονίδιο *hraB* που προέρχεται από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν *hraB*-διαγονιδιακές σειρές T₂ γενιάς, στις οποίες είχε προηγουμένως επιβεβαιωθεί η ομοζύγωτη φύση τους με βάση τη δυνατότητα βλάστησης σε θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής που περιέχει καναμυκίνη (kanamycin: 150 µg/ml).

Συγκεκριμένα, στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας, αξιοποιήθηκαν οι διαγονιδιακές σειρές *hraB* 1-2, *hraB* 2-2, *hraB* 4-2 και *hraB* 6-1. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν, ως μάρτυρες, και φυτά αγρίου τύπου (Wild Type-WT).

2.2 Ανάπτυξη διαγονιδιακών *hraB*-σειρών

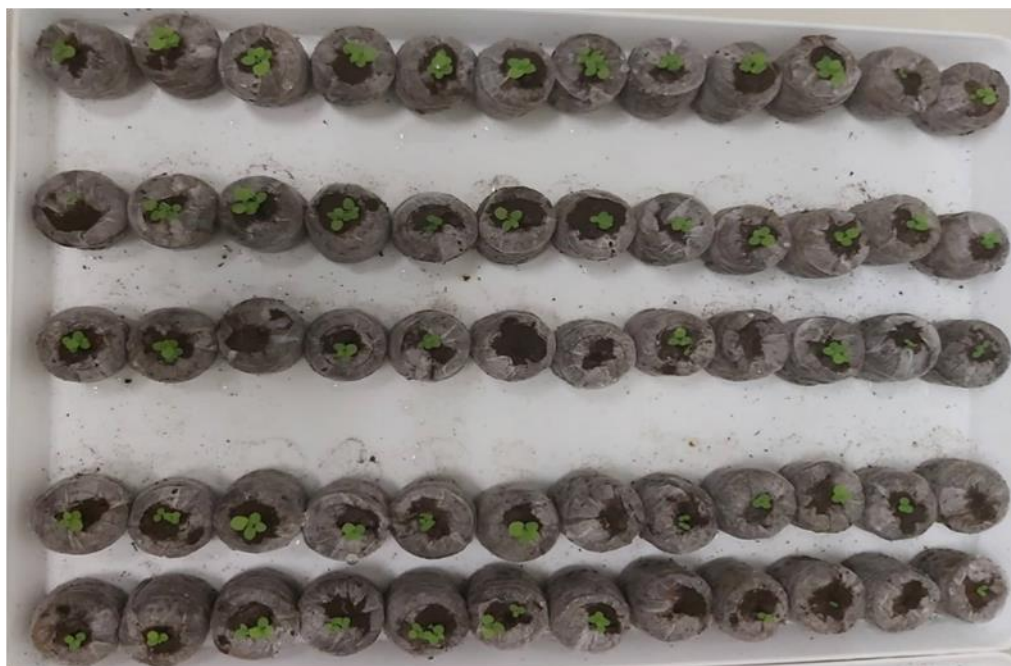
Αρχικά, σε έναν δίσκο τοποθετήθηκαν συνολικά 60 jiffy pots σε 5 κάθετες γραμμές (12 jiffy pot σε κάθε γραμμή). Η κάθε γραμμή αφορούσε την εκάστοτε διαγονιδιακή σειρά συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα (Wild Type-WT). Στη συνέχεια, με τη χρήση του υδροβολέα, τα jiffy pots απορρόφησαν την ανάλογη υγρασία για την κατάλληλη τοποθέτηση των σπόρων.

2.2.1 Απολύμανση σπόρων

Προκειμένου να επιτευχθεί η ανάπτυξη των επιλεγμένων σειρών, αρχικά έγινε απολύμανση των σπόρων (17/10/2019) σε τράπεζα νηματικής ροής, η οποία είχε προηγουμένως αποστειρωθεί με UV ακτινοβολία για 15 λεπτά. Για την απολύμανση των σπόρων έγινε τοποθέτησή τους σε τρυβλίο petri και εφαρμογή καθαρής αιθανόλης για 1 λεπτό.

2.2.2 Βλάστηση σπόρων

Οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε jiffy pots (2 σπόροι ανά jiffy pot). Τα jiffy pots παρέμειναν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας (25 °C) και φωτοπεριόδου (16h φώς/8h σκοτάδι), εφαρμόζοντας τακτικά ποτίσματα (~200 ml/2 ημέρες).



Εικόνα 2.1: Βλάστηση των διαγονιδιακών *hpaB*-σειρών του είδους *N. benthamiana* σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου.

2.2.3 Μεταφύτευση φυτών

Ακολούθησε μεταφύτευση των σποροφύτων σε φυτοδοχεία που περιείχαν μίγμα χώματος : περλίτη, σε αναλογία 3 : 1, με σκοπό τη μεμονωμένη και απρόσκοπτη ανάπτυξή τους (18/01/2020). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου, για διάστημα 45 ημερών, εφαρμόζοντας τακτικά ποτίσματα (~400 ml / 2ημέρες) έως ότου φτάσουν σε κατάλληλο στάδιο για την τεχνητή μόλυνσή τους με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.



Εικόνα 2.2: Ανάπτυξη των διαγονιδιακών *hpaB*-σειρών του είδους *N. benthamiana* σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου.

2.3 Τεχνητή μόλυνση των φυτών με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Προκειμένου να ελεγχθεί η ανθεκτικότητα των *hpaB*-διαγονιδιακών σειρών του είδους *N. benthamiana* υπό συνθήκες βιοτικής καταπόνησης, πραγματοποιήθηκε τεχνητή μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, και ειδικότερα το στέλεχος DC 585. Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε σε φυτά που βρίσκονταν στο στάδιο των 8 πραγματικών φύλλων, ηλικίας περίπου 4 μηνών (02/03/2020).

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 60 φυτά, 12 φυτά ανά *hpaB*-σειρά και 12 φυτά άγριου τύπου (WT), εκ των οποίων οι 6 επαναλήψεις μολύνθηκαν και οι 6 εξυπηρέτησαν ως αρνητικοί μάρτυρες.

2.3.1 Καλλιέργεια βακτηρίου

Το βακτήριο παραλήφθηκε από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο σε δοκιμαστικό σωλήνα. Για την καλλιέργεια του βακτηρίου, αρχικά παρασκευάστηκε υγρό θρεπτικό μέσο King's B medium (200 ml) το οποίο περιείχε: 4 g πεπτόνη (peptone), 3 g γλυκερόλη (glycerol), 3 g MgSO₄ (θειικό μαγνήσιο) και 0,392 g KH₂PO₄

(δισόξινο φωσφορικό κάλιο). Ακολούθησε αποστείρωση του θρεπτικού μέσου (120 °C).

Η καλλιέργεια του βακτηρίου έγινε σε falcon των 50 ml, το οποίο περιείχε 10 ml King's B medium, 20μl τετρακυκλίνη (tetracycline), 1 μl καναμυκίνη (kanamycin) και βακτηριακό μόλυσμα που λήφθηκε από το δοκιμαστικό σωλήνα. Τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύχθηκαν στους 28 °C, υπό ανάδευση, για χρονικό διάστημα 2 ημερών.

2.3.2 Δημιουργία βακτηριακού μολύσματος

Έπειτα από την επώαση του βακτηρίου, έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της βακτηριακής καλλιέργειας. Όταν η οπτική πυκνότητα ισούτο με 1 ($OD_{600} = 1$), έγινε φυγοκέντρωση στις 3.000 rpm για 5 λεπτά. Ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε αποστειρωμένο dH₂O ώστε να δημιουργηθεί αιώρημα βακτηρίων με συγκέντρωση 10^8 cfu/ml. Τέλος, έγινε προσθήκη Tween-20 (0,5 %).

2.3.3 Μόλυνση των φυτών

Για την τεχνητή μόλυνση των φυτών, ως μόλυσμα χρησιμοποιήθηκε το εναιώρημα βακτηρίων. Τα φυτά ψεκάστηκαν με το εναιώρημα βακτηρίων και ακολούθησε η κάλυψή τους με πλαστικό κάλυμμα, όπου παρέμειναν για 2 μέρες.

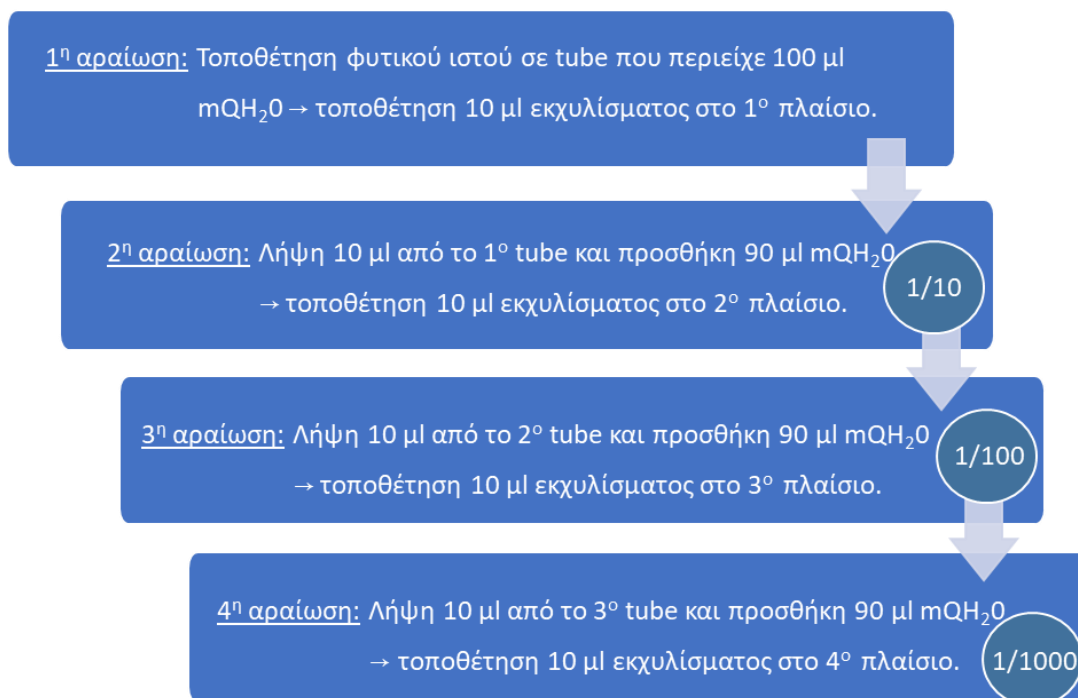
2.4 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Στο πλαίσιο αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, λαμβάνονταν τακτικά παρατηρήσεις μακροσκοπικά και πραγματοποιήθηκε καταγραφή της συμπτωματολογίας των φυτών σε διάστημα δύο ημερών (04/03/2020), τεσσάρων ημερών (06/03/2020), επτά ημερών (09/03/2020) και δέκα ημερών (12/03/2020), έπειτα από την τεχνητή μόλυνση. Η συμπτωματολογία αξιολογήθηκε συγκριτικά με φυτά μάρτυρες, στα οποία δεν είχε πραγματοποιηθεί τεχνητή μόλυνση.

Περαιτέρω, η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας αφορούσε σε ποσοτικοποίηση του παθογόνου βακτηρίου εντός των φυτών, μέσω προσδιορισμού του αριθμού αποικιών των βακτηρίων. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκε στερεό θρεπτικό μέσο King's B medium (1 lt), το οποίο περιείχε: 20 g πεπτόνη (peptone), 15 ml γλυκερόλη (glycerol), 15 g MgSO₄ (θειικό μαγνήσιο), 1.96 g KH₂PO₄ (δισόξινο φωσφορικό κάλιο) και 15 g άγαρ (agar). Έπειτα από αποστείρωση του θρεπτικού μέσου (120 °C), ακολούθησε επίστρωση του θρεπτικού διαλύματος σε τετράγωνα τριβλία, στα οποία είχε προηγηθεί διαγράμμιση προκειμένου να καταστεί εφικτή η καταμέτρηση των αποικιών σε κάθε μία από τις χρησιμοποιούμενες διαδοχικές αραιώσεις.

Για την ποσοτικοποίηση του βακτηρίου στα μολυσμένα φυτά, λήφθηκαν δείγματα ιστού νεαρών φύλλων από τέσσερα φυτά για κάθε *hpaB*-σειρά (*hpaB* 1-2, *hpaB* 2-2, *hpaB* 4-2 και *hpaB* 6-1) καθώς και από τέσσερα φυτά WT. Επιπλέον, λήφθηκαν δείγματα ιστού από δύο φυτά της σειράς *hpaB* 2-2, τα οποία δεν είχαν μολυνθεί με το βακτήριο και εξυπηρέτησαν ως μάρτυρες προκειμένου να ελεγχθεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε 1,5 ml Eppendorf tubes που περιείχαν 100 μl αποστειρωμένο mQ νερό και λειοτριβήθηκαν με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου. Η διαδικασία δημιουργίας των διαδοχικών αραιώσεων (1/10, 1/100, 1/1000) έγινε όπως περιγράφεται στην Εικόνα 2.3.

Η μέτρηση των αποικιών έγινε 24 ώρες (03/03/2020) και 72 ώρες (05/03/2020) μετά την τεχνητή μόλυνση με το βακτήριο. Η καταμέτρηση των αποικιών έγινε 24 ώρες μετά την επίστρωση των εκχυλισμάτων στις προαναφερθείσες διαδοχικές αραιώσεις. Συνεπώς, οι μετρήσεις των βακτηριακών αποικιών σε χρονικό διάστημα 24 ωρών μετά την μόλυνση έγιναν στις 04/03/2020, ενώ οι αντίστοιχες μετρήσεις σε χρονικό διάστημα 72 ωρών μετά την μόλυνση, έγιναν στις 06/03/2020.



Εικόνα 2.3: Διαδικασία δημιουργίας των διαδοχικών αραιώσεων σε εκχυλίσματα φυτών (*hpaB*-σειρές και WT) του είδους *N. benthamiana*, έπειτα από μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

2.5 Μέτρηση του ποσοστού χλωροφύλλης πριν και μετά την τεχνητή μόλυνση

Ο προσδιορισμός της περιεχόμενης ποσότητας χλωροφύλλης, πριν και μετά την τεχνητή μόλυνση, έγινε με τη χρήση του χλωροφυλλόμετρου SPAD-502 Plus (Minolta). Συγκεκριμένα, η μέτρηση της χλωροφύλλης πριν τη μόλυνση έλαβε χώρα στις 18/02/2020, ενώ πραγματοποιήθηκε επίσης μέτρηση και δέκα ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (12/03/2020). Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα που εντοπίζονταν στο μέσο της φυλλικής επιφάνειας των φυτών.

Αρχικά, έγινε καταγραφή του μέσου όρου χλωροφύλλης ανά φυτό (βιολογική επανάληψη) και ακολούθησε ο προσδιορισμός του συνολικού μέσου όρου ανά σειρά και ανά μεταχείριση, δηλαδή των φυτών-μαρτύρων και των μολυσμένων φυτών.

2.6 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με ANOVA ($p \leq 0.05$), σύμφωνα με το πειραματικό σχέδιο των πλήρων τυχαιοποιημένων ομάδων συνδυάζοντας τις κατηγορίες φυτών (*hpaB*-σειρές και φυτά WT) και τις υπό μελέτη μεταχειρίσεις (μάρτυρες και μολυσμένα φυτά). Οι διαφορές μεταξύ των μέσων όρων συγκρίθηκαν με τη χρήση της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD). Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου JMP v. 8.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση της έκφρασης του *hpaB* στο φαινότυπο των διαγονιδιακών φυτών

Η ενδογενής έκφραση του γονιδίου *hpaB*, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, στο είδος *Nicotiana benthamiana* δεν επηρέασε το φαινότυπο των φυτών καθώς δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα νέκρωσης ή άλλου τύπου παρεκκλίσεις από το φυσιολογικό. Συνεπώς, τα *hpaB*-διαγονιδιακά φυτά εμφάνιζαν μορφολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά που ήταν όμοια με τα φυτά άγριου τύπου (WT), όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.1.



Εικόνα 3.1: Συγκριτική απεικόνιση των *hpaB*-φυτών και των φυτών άγριου τύπου (WT). Παρατηρείται ομοιότητα ως προς τα μορφολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των φυτών. **A.** φυτά άγριου τύπου **B.** φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaB* 6-1.

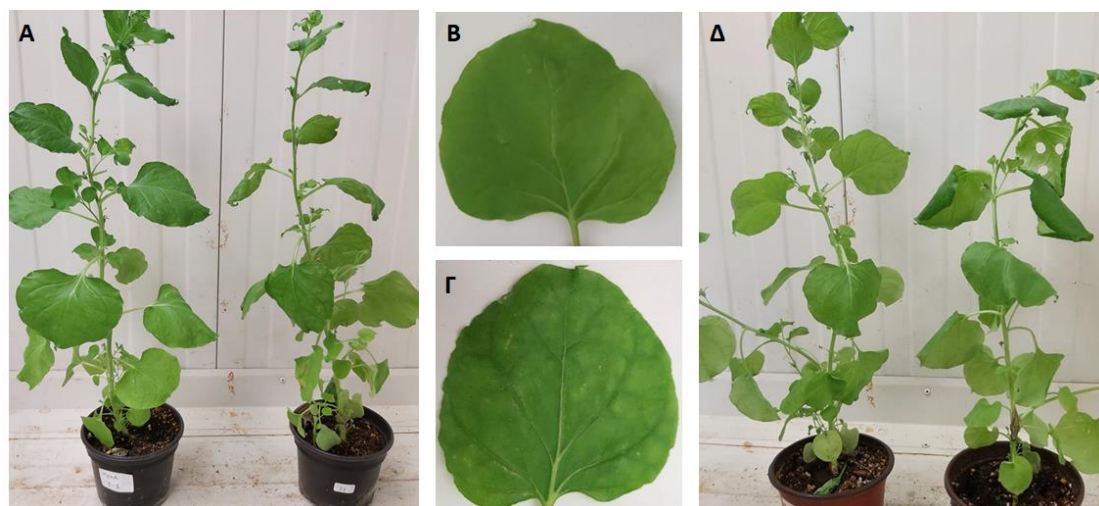
3.2 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Μετά την μόλυνση των διαγονιδιακών φυτών καθώς και των φυτών άγριου τύπου (Wild Type-WT), αυτά παρέμειναν σκεπασμένα με πλαστικό κάλυμμα

προκειμένου να αναπτυχθεί το βακτηριακό στέλεχος. Έπειτα από δύο ημέρες, απομακρύνθηκε το πλαστικό κάλλυμα και ανά τακτά χρονικά διαστήματα καταγράφονταν τυχόν συμπτώματα που εμφάνιζε κάθε σειρά φυτών.

3.2.1 Συγκριτική αξιολόγηση της συμπτωματολογίας των φυτών

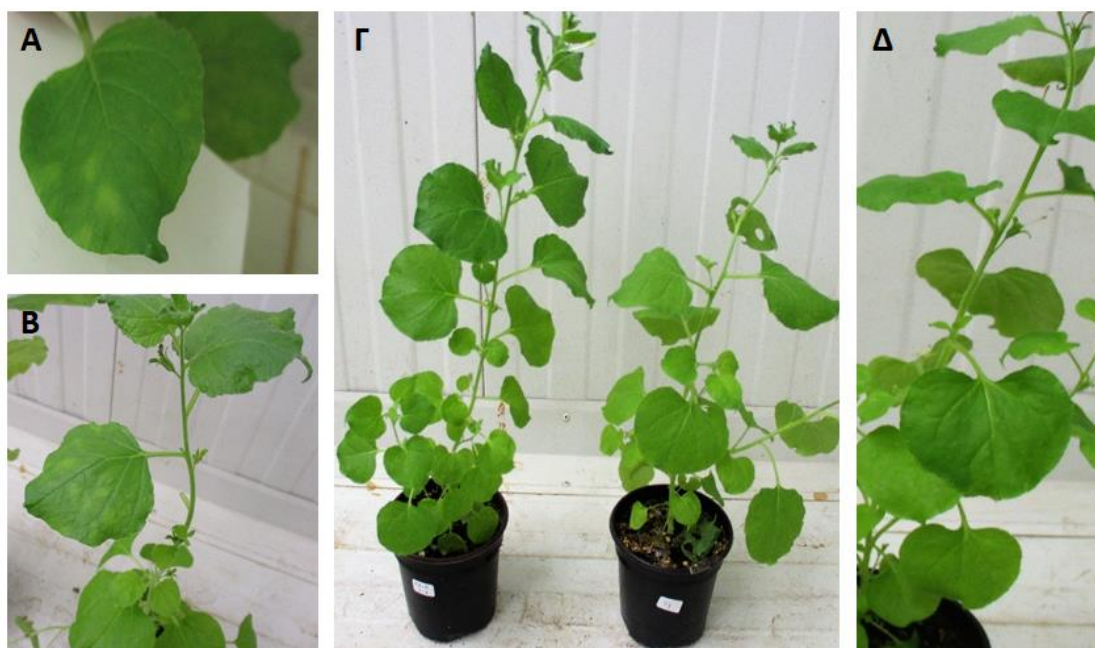
Έπειτα από τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, η πλειοψηφία των φυτών εμφάνισαν ήπια συμπτώματα χλώρωσης και μαρασμού, ήδη από τη 2^η κιόλας ημέρα μετά τη μόλυνση. Αν και το σύνολο των φυτών, εμφάνισαν συμπτώματα της ασθένειας, οι υπό μελέτη κατηγορίες φυτών διέφεραν μεταξύ τους ως προς τη συμπτωματολογία. Τα φυτά αγρίου τύπου καθώς και τα φυτά της σειράς *hpaB* 2-2 χαρακτηρίζονταν από την εμφάνιση χλωρωτικών κηλίδων στα μεσαία φύλλα (Εικόνα 3.2). Αντίθετα, τα φυτά των σειρών *hpaB* 1-2 και *hpaB* 4-2 παρουσίασαν χλωρωτικές κηλίδες στα ανώτερα φύλλα, ενώ τα φυτά της σειράς *hpaB* 6-1 εμφάνισαν συμπτώματα ήπιου μαρασμού (Εικόνα 3.2). Παρά την εκδήλωση των ανωτέρω συμπτωμάτων, το σύνολο των φυτών εμφάνισε φυσιολογική ανάπτυξη, η οποία αυξάνονταν σταδιακά με την πάροδο του χρόνου.



Εικόνα 3.2: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, δύο ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Α.** Φυτά αγρίου τύπου (WT), όπου είναι ορατή η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων στα μεσαία φύλλα **Β.** Ανώτερο φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hpaB* 1-2 **Γ.** Μεσαίο φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hpaB* 2-2, όπου είναι ορατή η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων **Δ.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaB* 6-1, όπου είναι ορατή η εμφάνιση συμπτωμάτων ήπιου μαρασμού.

Τέσσερις ημέρες μετά την μόλυνση, η πλειοψηφία των φυτών εμφάνισε περισσότερο διακριτές και εκτεταμένες χλωρωτικές κηλίδες. Τόσο τα φυτά άγριου τύπου όσο και τα φυτά που προέρχονταν από τις σειρές *hpaB* 2-2 και *hpaB* 4-2 χαρακτηρίζονταν από την εμφάνιση έντονων χλωρωτικών κηλίδων στα ανώτερα φύλλα. Αντίθετα, η διαγονιδιακή σειρά *hpaB* 1-2 παρουσίασε ήπια συμπτωματολογία, η οποία αφορούσε σε περιορισμένη ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων και κύρτωση του ελάσματος προς τα κάτω. Τέλος, τα φυτά της σειράς *hpaB* 6-1 διαφοροποιήθηκαν ως προς τα συμπτώματά τους, τα οποία αφορούσαν κυρίως σε ήπια χλώρωση. Στην Εικόνα 3.3, παρουσιάζεται συγκριτικά η συμπτωματολογία των φυτών τέσσερις ημέρες μετά τη μόλυνση.

Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι στις τέσσερις ημέρες μετά τη μόλυνση, τα μολυσμένα φυτά εμφάνισαν ελαφρώς διαφοροποιημένη ανάπτυξη συγκριτικά με τους μάρτυρες. Ειδικότερα, τα μολυσμένα φυτά χαρακτηρίζονταν από ελαφρώς μειωμένη ανάπτυξη, χωρίς ωστόσο να σημειώνεται πλήρης αναστολή της ανάπτυξής τους.



Εικόνα 3.3: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, τέσσερις ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Φυτά άγριου τύπου (WT), όπου είναι εμφανής η ανάπτυξη εκτεταμένων χλωρωτικών κηλίδων στα μεσαία φύλλα. **B.** Ανώτερο φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hpaB* 4-2, όπου διακρίνονται χλωρωτικές κηλίδες. **Γ.** Φυτά της σειράς *hpaB* 1-2, τα οποία εμφανίζουν κύρτωση του ελάσματος προς τα κάτω. **Δ.** Φυτά της σειράς *hpaB* 6-1, τα οποία εμφανίζουν ήπια χλώρωση.

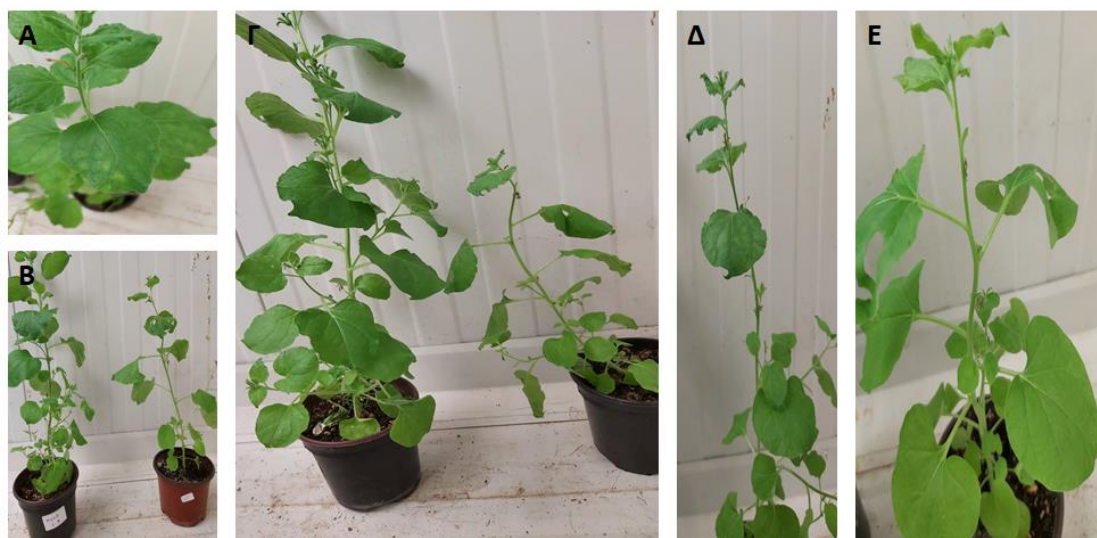
Κατ' αντιστοιχία, επτά ημέρες μετά τη μόλυνση τα φυτά εμφάνιζαν περισσότερο διακριτές χλωρωτικές κηλίδες αλλά και περισσότερο εκτεταμένη χλώρωση της φυλλικής επιφάνειας. Σύμφωνα και με τις προηγούμενες παρατηρήσεις, οι διαφορετικές κατηγορίες φυτών διέφεραν αισθητά ως προς τη συμπτωματολογία τους. Ειδικότερα, τα φυτά άγριου τύπου αλλά και τα φυτά των σειρών χαρακτηρίζονταν από την εμφάνιση έντονων χλωρωτικών κηλίδων στα μεσαία και ανώτερα φύλλα. Παρόμοια συμπτωματολογία παρουσίασαν τα φυτά των σειρών *hpaB 1-2* και *hpaB 4-2*, τα οποία εμφάνισαν χλωρωτικές κηλίδες στα ανώτερα και μεσαία φύλλα καθώς και ασθενή χλώρωση στα φύλλα κορυφής. Αντίθετα, τα φυτά της σειράς *hpaB 2-2* εμφάνισαν χλωρωτικές κηλίδες στα μεσαία και ανώτερα φύλλα καθώς και κύρτωση του ελάσματος προς τα κάτω, ενώ αυτά της σειράς *hpaB 6-1* χαρακτηρίζονταν από σαφώς πιο ήπια συμπτωματολογία, η οποία αφορούσε σε ήπια χλώρωση του ελάσματος.



Εικόνα 3.4: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, επτά ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Φυτά άγριου τύπου (WT), όπου είναι εμφανής η ανάπτυξη έντονων και εκτεταμένων χλωρωτικών κηλίδων στα μεσαία και ανώτερα φύλλα **B.** Φυτά της σειράς *hpaB 4-2*, που εμφανίζουν χλωρωτικές κηλίδες στα μεσαία και ανώτερα φύλλα **Γ.** Φυτά της σειράς *hpaB 2-2* που εμφανίζουν χλωρωτικές κηλίδες στα μεσαία και ανώτερα φύλλα και κύρτωση του ελάσματος προς τα κάτω **Δ.** Φυτά της σειράς *hpaB 6-1* με συμπτώματα ήπιας χλώρωσης του ελάσματος.

Κατά το διάστημα των δέκα ημερών μετά τη μόλυνση, η εκδήλωση συμπτωμάτων ήταν σαφώς πιο έντονη στο σύνολο των φυτών, με τη συμπτωματολογία ωστόσο να διαφοροποιείται μεταξύ των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών. Έτσι, τα φυτά αγρίου τύπου καθώς και αυτά των σειρών *hpaB 1-2* και *hpaB 4-2* παρουσίασαν χλωρωτικές κηλίδες, οι οποίες εκτείνονταν στα μεσαία και ανώτερα φύλλα. Ωστόσο, τα φυτά των σειρών *hpaB 1-2* και *hpaB 2-2* χαρακτηρίζονταν από κύρτωση του ελάσματος προς τα κάτω. Σε συμφωνία με τις προηγούμενες παρατηρήσεις, τα φυτά της σειράς *hpaB 6-1* χαρακτηρίζονταν από σαφώς πιο ήπια συμπτωματολογία, η οποία αφορούσε σε ήπια χλώρωση του ελάσματος. Στην Εικόνα 3.5, παρουσιάζεται συγκριτικά η συμπτωματολογία των φυτών δέκα ημέρες μετά τη μόλυνση.

Στο διάστημα των δέκα ημερών μετά τη μόλυνση, τα μολυσμένα φυτά εμφάνισαν μειωμένη ανάπτυξη, συγκριτικά με τους μάρτυρες, χωρίς ωστόσο να σημειώνεται πλήρης αναστολή της ανάπτυξής τους.



Εικόνα 3.5: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, δέκα ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Φυτά άγριου τύπου (WT), όπου είναι εμφανής η ανάπτυξη έντονων και εκτεταμένων χλωρωτικών κηλίδων στα μεσαία και ανώτερα φύλλα **B.** Φυτά της σειράς *hpaB 1-2* που εμφανίζουν χλωρωτικές κηλίδες και κύρτωση του ελάσματος προς τα κάτω **Γ.** Φυτά της σειράς *hpaB 2-2* που εμφανίζουν κύρτωση του ελάσματος προς τα κάτω **Δ.** Φυτά της σειράς *hpaB 4-2* που εμφανίζουν έντονες χλωρωτικές κηλίδες στα ανώτερα φύλλα **Ε.** Φυτά της σειράς *hpaB 6-1* με συμπτώματα ήπιας χλώρωσης του ελάσματος.

Τα συνολικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μακροσκοπική αξιολόγηση των φυτών ανέδειξαν την εκδήλωση συμπτωμάτων, η οποία, όπως αναμενόταν, γινόταν σταδιακά εντονότερη με την πάροδο του χρόνου. Η συμπτωματολογία αφορούσε κυρίως σε χλωρωτικές κηλίδες και δευτερευόντως σε κύρτωση του ελάσματος προς τα κάτω. Σε επίπεδο κατηγορίας φυτών, τα φυτά άγριου τύπου εμφάνισαν παρόμοια συμπτώματα με τα φυτά των σειρών *hpaB-1-2*, *-2-2* και *-4-2*. Εξαίρεση ωστόσο αποτέλεσε η συμπτωματολογία της σειράς *hpaB 6-1*, η οποία υπήρξε σαφώς πιο ήπια και αφορούσε αποκλειστικά σε περιορισμένη χλώρωση του ελάσματος. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* οδήγησε σε ορισμένη αναχαίτηση της ανάπτυξης των φυτών, η οποία εκδηλώθηκε με μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης, συγκριτικά με τους μάρτυρες, και περιορισμό της φυλλικής επιφάνειας.

3.2.2 Συγκριτική αξιολόγηση της αποίκησης του βακτηρίου στα μολυσμένα φυτά

Με στόχο τη μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hpaB* σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana*, ως προς την ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης του καπνού, έγινε ποσοτικοποίηση του παθογόνου βακτηρίου σε φυτά που μολύνθηκαν με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Για το σκοπό αυτό, λήφθηκαν δείγματα φυτικού ιστού, 24 και 72 ώρες μετά τη μόλυνση, και εκτιμήθηκε η αποίκηση του βακτηρίου, μέσω προσδιορισμού του αριθμού αποικιών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο επιλογής. Η αποίκηση του βακτηρίου αξιολογήθηκε συγκριτικά στα φυτά των *hpaB*-σειρών και στα φυτά άγριου τύπου. Συγκεκριμένα, λήφθηκαν δείγματα φύλλων από 4 φυτά για κάθε κατηγορία φυτών. Επίσης, στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες και δείγματα φυτικού ιστού που προέρχονταν από μη μολυσμένα φυτά της σειράς *hpaB 2-2*. Στο πλαίσιο εκτίμησης της αποίκησης του βακτηρίου, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις ώστε να επιλεχθεί η καταλληλότερη προς μέτρηση.

3.2.2.1 Αποίκηση του βακτηρίου 24h μετά την μόλυνση

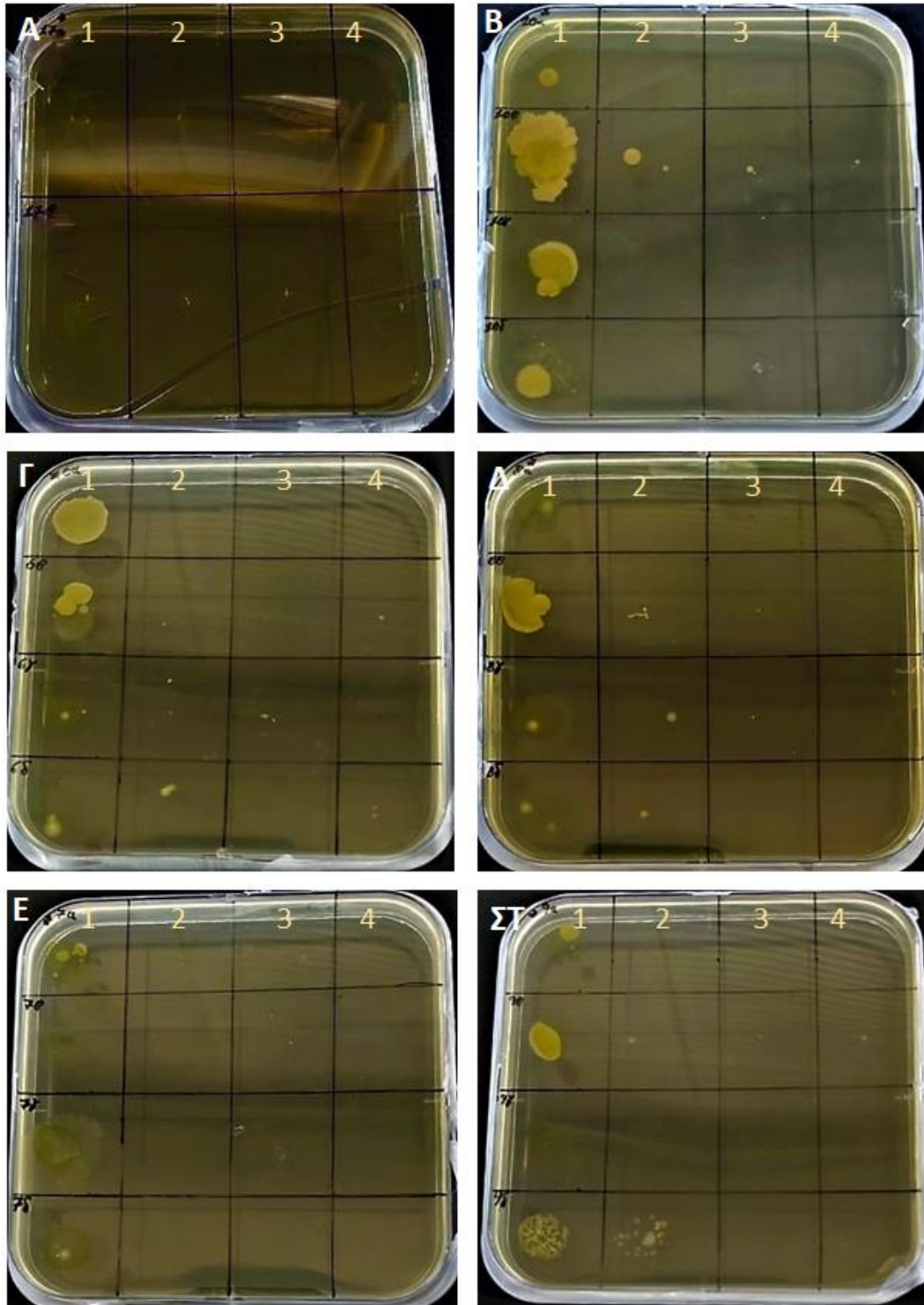
Η πρώτη καταμέτρηση των αποικιών των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε 24 ώρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, η αποίκιση του βακτηρίου στα εκχυλίσματα της 1^{ης} αραίωσης δε διέφερε μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών φυτών. Παρά την απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των κατηγοριών των φυτών, με τα φυτά αγρίου τύπου και τα φυτά της σειράς *hpaB* 2-2 να εμφανίζουν το μεγαλύτερο και μικρότερο αριθμό αποικιών αντίστοιχα (Πίνακας 3.1).

Αντίθετα, κατά τη 2^η αραίωση, η ανάλυση κατέδειξε την ύπαρξη διαφορών στα εκχυλίσματα των διαφορετικών κατηγοριών φυτών. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα φυτά των σειρών *hpaB* 4-2 και *hpaB* 6-1 εμφάνισαν μηδενική αποίκιση, ενώ μικρό αριθμό αποικιών εμφάνισαν τα φυτά αγρίου τύπου, ακολουθούμενα από αυτά της σειράς *hpaB* 1-2. Σημαντική διαφορά σημειώθηκε στα φυτά της σειράς *hpaB* 2-2, τα οποία χαρακτηρίζονταν από αυξημένο αριθμό αποικιών (Πίνακας 3.1). Στα φυτικά εκχυλίσματα των υπόλοιπων αραιώσεων, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών βακτηρίων. Στην Εικόνα 3.6 παρουσιάζεται συγκριτικά η αποίκιση του βακτηρίου σε θρεπτικό μέσο επιλογής όπου έχει γίνει επίστρωση των φυτικών εκχυλισμάτων που προέρχονται από τα μολυσμένα φυτά.

Πίνακας 3.1: Αποίκιση του βακτηρίου σε φυτά του είδους *N. benthamiana*, 24 ώρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρά (G)	Αποίκιση βακτηρίου			
	1 ^η αραίωση		2 ^η αραίωση	
WT	6,33	a	0,33	b
<i>hpaB</i> 1-2	3,33	a	0,66	ab
<i>hpaB</i> 2-2	2,33	a	1,33	a
<i>hpaB</i> 4-2	4,33	a	0,00	b
<i>hpaB</i> 6-1	3,00	a	0,00	b



Εικόνα 3.6: Συγκριτική απεικόνιση των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε φυτικό ιστό του είδους *Nicotiana benthamiana*, 24 ώρες έπειτα από τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Τα τρυβλία εμφανίζονται διαιρεμένα και κάθε κελί αφορά στις διαφορετικές διαδοχικές αραιώσεις (αρχικό εκχύλισμα, 1/10, 1/100, 1/1000) **A.** Ιστός που προέρχεται από υγιή, μη μολυσμένο φυτό της σειράς *hpaB 2-2* (μάρτυρας) **B.** Ιστός που προέρχεται από φυτό αγρίου τύπου (WT) **Γ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB 1-2* **Δ.** Ιστός που

προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB* 2-2 **Ε**. Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB* 4-2 **ΣΤ**. Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB* 6-1.

3.2.2.2 Αποίκιση του βακτηρίου 72h μετά την μόλυνση

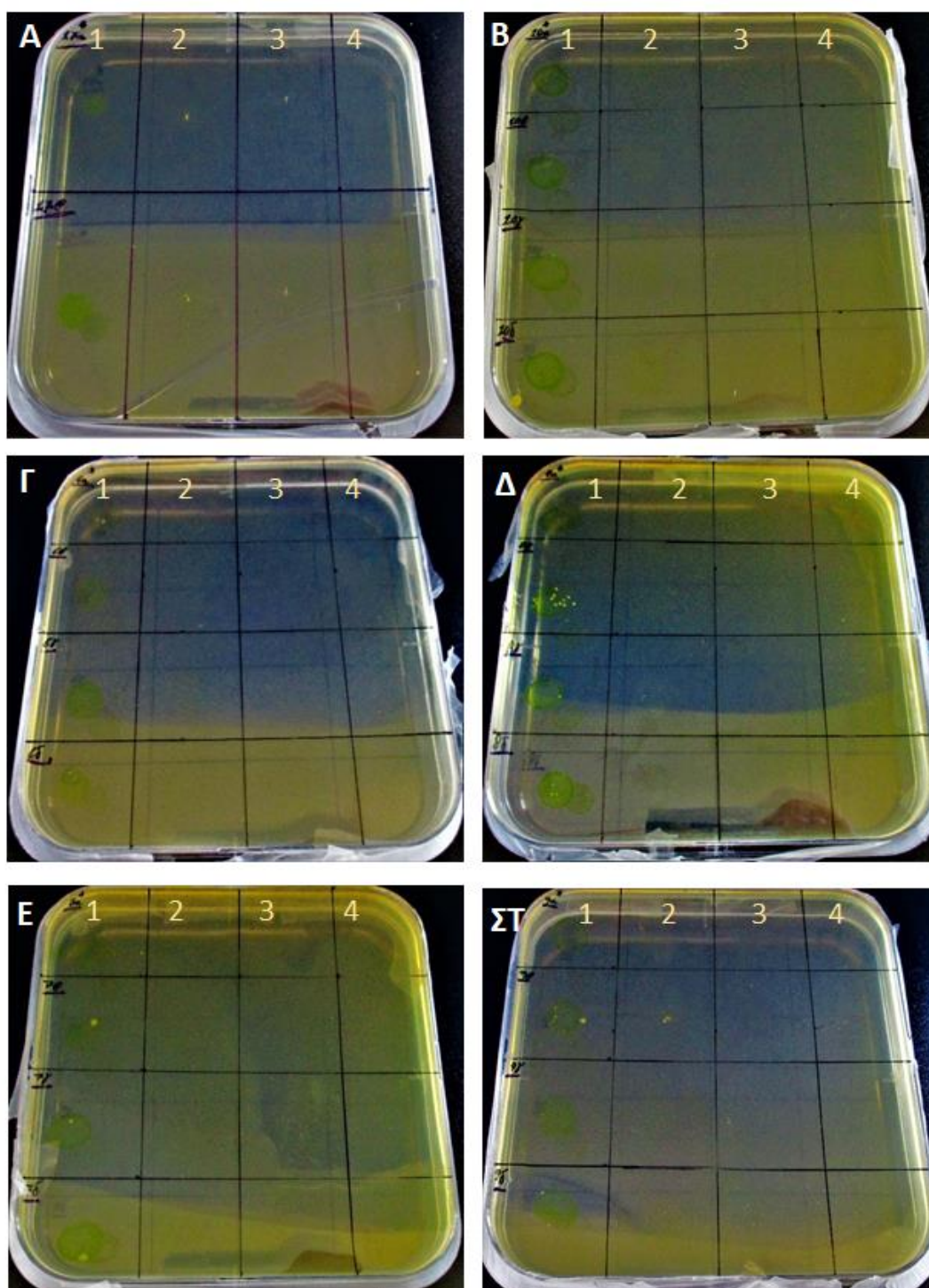
Η δεύτερη καταμέτρηση των αποικιών των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε 72 ώρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης κατέδειξαν την ύπαρξη διαφορών στην αποίκιση του βακτηρίου μεταξύ των εκχυλισμάτων της 1^{ης} αραίωσης που προέρχονταν από τις διαφορετικές κατηγορίες φυτών. Ειδικότερα, τα φυτά της σειράς *hpaB* 2-2 εμφάνισαν το μεγαλύτερο αριθμό αποικιών, ακολουθούμενα από τα φυτά της σειράς *hpaB* 6-1 (Πίνακας 3.2). Σημαντικά μειωμένο αριθμό αποικιών εμφάνισαν τα φυτά αγρίου τύπου καθώς και αυτά των σειρών *hpaB* 1-2 και *hpaB* 4-2 (Πίνακας 3.2).

Αναφορικά με την 2^η αραίωση, η ανάλυση κατέδειξε την απουσία διαφορών στα εκχυλίσματα των διαφορετικών κατηγοριών φυτών. Παρά την απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών, η διαγονιδιακή σειρά η οποία εμφάνισε το μεγαλύτερο αριθμό αποικιών, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες σειρές, ήταν η *hpaB* 6-1 (Πίνακας 3.2). Στα φυτικά εκχυλίσματα των υπόλοιπων αραιώσεων, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών βακτηρίων. Στην Εικόνα 3.7 παρουσιάζεται συγκριτικά η αποίκιση του βακτηρίου σε θρεπτικό μέσο επιλογής όπου έχει γίνει επίστρωση των φυτικών εκχυλισμάτων που προέρχονται από τα μολυσμένα φυτά.

Πίνακας 3.2: Αποίκιση του βακτηρίου σε φυτά του είδους *N. benthamiana*, 72 ώρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρά (G)	Αποίκιση βακτηρίου			
	1 ^η αραίωση		2 ^η αραίωση	
WT	2,66	b	0,00	a
<i>hpaB</i> 1-2	3,33	b	0,33	a
<i>hpaB</i> 2-2	15,33	a	0,66	a
<i>hpaB</i> 4-2	5,66	b	0,66	a
<i>hpaB</i> 6-1	6,66	ab	2,00	a



Εικόνα 3.7: Συγκριτική απεικόνιση των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε φυτικό ιστό του είδους *Nicotiana benthamiana*, 72 ώρες έπειτα από τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Τα τρυβλία εμφανίζονται διαιρεμένα και κάθε κελί αφορά στις διαφορετικές διαδοχικές αραιώσεις (αρχικό εκχύλισμα, 1/10, 1/100, 1/1000) **Α.** Ιστός που προέρχεται από υγιή, μη μολυσμένο φυτό της σειράς *hpaB* 2-2 (μάρτυρας) **Β.** Ιστός που προέρχεται από φυτό αγρίου τύπου (WT) **Γ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB*

1-2 Δ. Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB* 2-2 Ε. Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB* 4-2 ΣΤ. Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hpaB* 6-1.

3.3 Συγκριτική αξιολόγηση των τιμών χλωροφύλλης πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Με στόχο τη μελέτη της επίδρασης της βακτηριακής μόλυνσης συγκριτικά στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaB*-διαγονιδιακές σειρές, εκτιμήθηκε η ποσότητα περιεχόμενης χλωροφύλλης στα φυτά πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Για το σκοπό αυτό, έγινε μέτρηση της χλωροφύλλης με τη χρήση του χλωροφυλλόμετρου SPAD σε πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα που εντοπίζονταν στο μέσο της φυλλικής επιφάνειας των φυτών.

3.3.1 Τιμές χλωροφύλλης πριν την μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

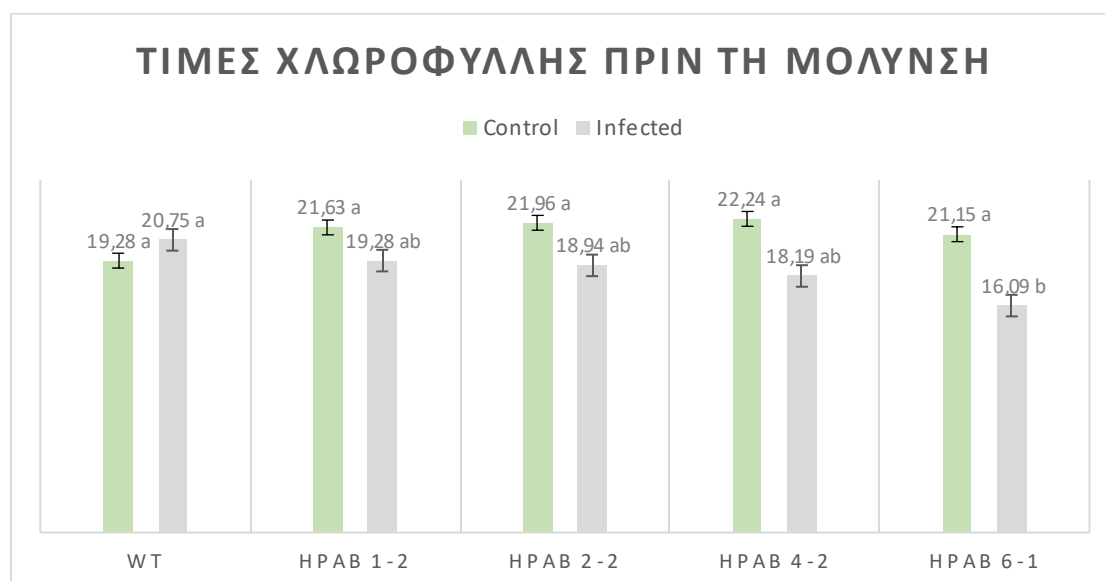
Οι τιμές της χλωροφύλλης που παρουσίασαν τα φυτά που ανήκουν στις δύο κατηγορίες μεταχειρίσεων (μάρτυρες και μολυσμένα φυτά), πριν τη μόλυνση, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της ανάλυσης, οι τιμές της χλωροφύλλης δε διέφεραν στους μάρτυρες των διαφορετικών κατηγοριών φυτών. Παρά την απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών, τη μικρότερη ποσότητα χλωροφύλλης εμφάνισαν τα φυτά αγρίου τύπου (19,28), ενώ οι μεγαλύτερες τιμές σημειώθηκαν στα φυτά της σειράς *hpaB* 4-2 (22,24). Παραδόξως, πριν από τη μόλυνση, τα φυτά που επρόκειτο να μολυνθούν διαφέρουν ως προς την ποσότητα χλωροφύλλης, με τα φυτά αγρίου τύπου και αυτά της σειράς *hpaB* 6-1 να εμφανίζουν τη μικρότερη και τη μεγαλύτερη τιμή αντίστοιχα (20,75 και 16,09). Ωστόσο, όπως προκύπτει από τις μέσες τιμές των μεταχειρίσεων, οι διαφορετικές κατηγορίες φυτών δε διέφεραν σημαντικά ως προς την ποσότητα χλωροφύλλης.

Πίνακας 3.3: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaB*-διαγονιδιακές σειρές, πριν τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρές (G)	Μεταχείριση (T)		
	Μάρτυρες	Μολυσμένα φυτά	M.O. (C)
WT	19,28a	20,75a	20,02a
<i>hpaB</i> 1-2	21,63a	19,28ab	20,56a
<i>hpaB</i> 2-2	21,96a	18,94ab	20,75a
<i>hpaB</i> 4-2	22,24a	18,19ab	20,40a
<i>hpaB</i> 6-1	21,15a	16,09b	18,62a
M.O. (G)	21,33a	18,64b	

Στο Διάγραμμα 3.1 παρουσιάζονται συγκριτικά οι τιμές της χλωροφύλλης των μαρτύρων και των φυτών που επρόκειτο να μολυνθούν, πριν από τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.



Διάγραμμα 3.1: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaB*-διαγονιδιακές σειρές, πριν τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

3.3.2 Τιμές χλωροφύλλης μετά την μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

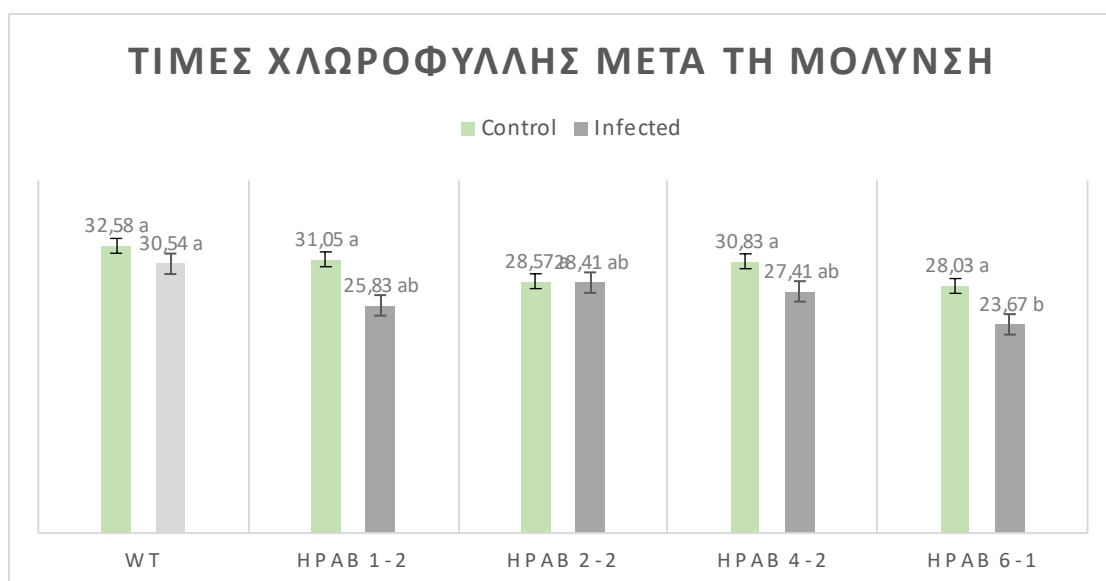
Οι τιμές της χλωροφύλλης που παρουσίασαν τα φυτά που ανήκουν στις δύο κατηγορίες μεταχειρίσεων (μάρτυρες και μολυσμένα φυτά), 10 ημέρες μετά τη

μόλυνση, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της ανάλυσης, η ποσότητα χλωροφύλλης δε διέφερε στους μάρτυρες των διαφορετικών κατηγοριών φυτών. Αντίθετα, στα φυτά που μολύνθηκαν με το βακτήριο σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την ποσότητα χλωροφύλλης. Ειδικότερα, τη μεγαλύτερη τιμή εμφάνισαν τα φυτά αγρίου τύπου (32,58), ενώ σημαντικά μειωμένη τιμή εμφάνισαν τα φυτά της σειράς *hpaB 6-1* (28,03). Επίσης, σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν και σε επίπεδο μεταχείρισης καθώς οι μάρτυρες εμφάνισαν μεγαλύτερες τιμές χλωροφύλλης (29,38), συγκριτικά με τα μολυσμένα φυτά (26,82), όπως προκύπτει από τις μέσες τιμές των μεταχειρίσεων.

Πίνακας 3.4: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaB*-διαγονιδιακές σειρές, 10 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρές (G)	Μεταχείριση (T)		
	Μάρτυρες	Μολυσμένα φυτά	M.O. (C)
WT	32,58a	30,54a	31,67a
<i>hpaB 1-2</i>	31,05a	25,83ab	28,68a
<i>hpaB 2-2</i>	28,57a	28,41ab	28,51a
<i>hpaB 4-2</i>	30,83a	27,41ab	29,28a
<i>hpaB 6-1</i>	28,03a	23,67b	25,85a
M.O. (G)	29,38a	26,82b	

Οι τιμές της χλωροφύλλης των μαρτύρων και των μολυσμένων φυτών, 10 ημέρες μετά τη μόλυνση παρουσιάζονται συγκριτικά στο Διάγραμμα 3.2. Όπως προκύπτει, οι μάρτυρες εμφανίζουν μεγαλύτερη ποσότητα χλωροφύλλης, συγκριτικά με τα μολυσμένα φυτά σε όλες τις κατηγορίες φυτών, γεγονός που αποδίδεται στη δυσμενή επίδραση του βακτηρίου.



Διάγραμμα 3.2: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaB*-διαγονιδιακές σειρές, 10 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι φυτικοί οργανισμοί συχνά αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα καταπονήσεων, όπου επικρατούν παράγοντες που παρεμποδίζουν την εύρυθμη λειτουργία των φυσιολογικών μηχανισμών των φυτών. Η αλληλεπίδραση των φυτών με παθογόνους μικροοργανισμούς οδήγησε στη σταδιακή εξέλιξη αμφότερων, η οποία είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη από μέρους των φυτών μηχανισμών άμυνας προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση του παραγόμενου αγροτικού προϊόντος.

Με δεδομένες τις απώλειες που συντελούνται υπό την επικράτηση βιοτικών παραγόντων καταπόνησης, η βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι των παθογόνων παραδοσιακά αποτελεί κύριο στόχο των βελτιωτικών προγραμμάτων για την πλειοψηφία των καλλιεργούμενων ειδών. Παρά το γεγονός ότι οι κλασικές βελτιωτικές προσεγγίσεις έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη πληθώρας ανθεκτικών ποικιλιών, οι σχετικές απώλειες απόδοσης εξακολουθούν να θέτουν σε κίνδυνο τη βιωσιμότητα των καλλιεργειών, περιορίζοντας ταυτόχρονα τη δυνατότητα καλλιέργειάς τους σε δυσμενή περιβάλλοντα. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον στρέφεται ολοένα και περισσότερο προς την αξιοποίηση των τεχνολογιών της Γενετικής Μηχανικής που πρακτικά επιτρέπουν τον εμπλουτισμό της γονιδιακής δεξαμενής με γονίδια ανθεκτικότητας, ανεξάρτητα από την ύπαρξη ταξινομικών εμποδίων. Στο πλαίσιο αυτό, η συμβολή της Γενετικής Μηχανικής αποτέλεσε εφιαλτήριο για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών που χαρακτηρίζονται από γενετική ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών καταπονήσεων σε ένα σημαντικό εύρος καλλιεργούμενων ειδών.

Με στόχο την επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών καταπονήσεων, σημαντική προσέγγιση αποτελεί η αξιοποίηση γονιδίων διαφορετικής προέλευσης και μηχανισμού δράσης. Στο επίπεδο αυτό, συνηθισμένη πρακτική αποτελεί τόσο η αξιοποίηση γονιδίων φυτικής προέλευσης, όπως αυτά που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες και σηματοδοτικά μόρια, όσο και η έκφραση γονιδίων που προέρχονται από παθογόνους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών-τελεστών που προέρχονται από φυτοπαθογόνα βακτήρια.

Είναι ευρέως γνωστό ότι οι τελεστές, που εκκρίνονται στα κύτταρα των φυτών-ξενιστών μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III (T3SS) (Coburn & Finlay, 2007),

έχουν διττό ρόλο σε ένα εύρος συστημάτων φυτών-παθογόνων (Alfano and Collmer, 2004; Kamoun, 2006). Συνεπώς, οι τελεστές συνεισφέρουν στην παθογένεια και εκδήλωση συμπτωμάτων σε φυτά ξενιστές, δρώντας ως παράγοντες μολυσματικότητας, ενώ σε ανθεκτικούς γονοτύπους και φυτά-μη ξενιστές δρουν ως παράγοντες αμολυσματικότητας, συμβάλλοντας στην ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών τους. Οι τελευταίοι, συχνά περιλαμβάνουν την επαγωγή της Αντίδρασης Υπερευαισθησίας (HR) (Alfano and Collmer, 2004; Kamoun, 2006; Slot & Knogge, 2010; Feng & Zhou, 2012). Η πλειονότητα των φυτοπαθογόνων βακτηρίων, εγχύει τις πρωτεΐνες στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω του T3SS.

Έχει αποδειχθεί ότι γονίδια φυτοπαθογόνων βακτηρίων είναι ικανά να επάγουν την ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων. Στο πλαίσιο αυτό, έχουν αξιοποιηθεί διάφορα γονίδια τα οποία αποτελούν δομικά συστατικά του T3SS. Μεταξύ αυτών, το γονίδιο *hrpZPsph*, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι της ασθένειας της ριζομανίας των ζαχαροτεύλων, η οποία προκαλείται από τον ιό *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV). Ειδικότερα, πρόσφατες έρευνες κατέδειξαν ότι η ενδογενής έκφραση της χαρπίνης *HrpZPsph* επάγει ανθεκτικότητα έναντι του ιού BNYVV τόσο σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* όσο και σε διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλου που είναι ο φυσικός ξενιστής του ιού (Pavli, et al., 2011; 2012). Κατ' αναλογία, η χαρπίνη *HrpN*, από το βακτήριο *Erwinia amylovora*, έχει αποδειχθεί ότι προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και του μύκητα *Peronospora parasitica* (Dong, et al., 1999) σε φυτά του είδους *A. thaliana*. Επιπλέον, σε φυτά ρυζιού που εκφράζουν ενδογενώς το γονίδιο *hrfI* παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα στην καταπόνηση ξηρασίας δια μέσω της σηματοδότησης ABA (abscisic oxide-αμπισισικό οξύ) (Zhang, et al., 2011).

Το γονίδιο, *hpaA*, που είναι υψηλά συντηρημένο στο γένος *Xanthomonas*, έχει αναδειχθεί ως ρυθμιστής του T3SS καθώς συμβάλλει στην έκκριση των T3SS συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των τελεστών, στο εσωτερικό των κυττάρων των φυτών-ξενιστών. Παράλληλα, η πρωτεΐνη HpaA δρα ως ρυθμιστής του HpaB, που είναι συστατικό του T3SS, καθώς η αλληλεπίδρασή τους οδηγεί στην απελευθέρωση του HpaB, η οποία είναι αναγκαία για την έκκριση των HpaB-εξαρτώμενων τελεστών (Lorenz, et al., 2008). Βάσει των ανωτέρω, έχει προταθεί ότι η πρωτεΐνη HpaA δρα ως τελεστής, λόγω της συμβολής της στην παθογένεια σε φυτά-ξενιστές και στην επαγωγή

της HR σε ανθεκτικούς γονοτύπους και φυτά-μη ξενιστές (Huguet, et al., 1998; Lorenz, et al., 2008; Büttner, et al., 2010).

Σχετικά με το γονίδιο *hpaB*, που προέρχεται από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, έχει αποδειχθεί ότι είναι αναγκαίο για το βακτηριακό του φορέα προκειμένου να υπάρξει πλήρης παθογένεια (Lonjon, et al., 2017). Με δεδομένου ότι η δράση του *hpaB* σε φυτά δεν έχει διερευνηθεί, στόχο της διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hpaB* σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* ως προς την ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών καταπονήσεων. Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε συγκριτικά η απόκριση διαγονιδιακών *hpaB*-σειρών και φυτών αγρίου τύπου στη μόλυνση με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tabaci*, χρησιμοποιήθηκαν ομοζύγωτες σειρές, ως προς το διαγονίδιο *hpaB*, καθώς και φυτά αγρίου τύπου που αξιοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Για το σκοπό αυτό, αρχικά έγινε ανάπτυξη φυτών T₂ γενιάς και ακολούθησε τεχνητή μόλυνση με εναιώρημα βακτηριακών κυττάρων. Η εκτίμηση της ανθεκτικότητας βασίστηκε σε μακροσκοπική παρατήρηση των φυτών αναφορικά με την ανάπτυξη συμπτωμάτων βακτηριακής κηλίδωσης καθώς και στην αποίκιση του βακτηρίου στα μολυσμένα φυτά. Τέλος, αξιολογήθηκε συγκριτικά και η ποσότητα περιεχόμενης χλωροφύλλης πριν και μετά τη μόλυνση των φυτών.

Αναφορικά με το φαινότυπο των φυτών που εκφράζουν ενδογενώς το γονίδιο *hpaB*, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη συμπτωμάτων στο είδος *N. benthamiana* καθώς τα διαγονιδιακά φυτά χαρακτηρίζονταν από όμοιο φαινότυπο με φυτά αγρίου τύπου ίδιου αναπτυξιακού σταδίου. Η απουσία νεκρωτικών ή άλλου τύπου συμπτωμάτων σε φυτά του είδους *N. benthamiana*, που εκφράζουν το γονίδιο *hpaB*, έχει αναδειχθεί και σε προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ότι τα διαγονιδιακά φυτά είχαν παρόμοιο φαινότυπο και ανάπτυξη με φυτά αγρίου τύπου (Mitsopoulou, et.al., 2018). Κατ' αντιστοιχία, φυτά που εκφράζουν *in planta* γονίδια που κωδικοποιούν χαρπίνες εμφάνιζαν φυσιολογικό φαινότυπο (Ταμπακάκη, 1999).

Η αξιολόγηση της φαινοτυπικής απόκρισης των *hpaB*-σειρών στη μόλυνση με το βακτήριο *P. syringae* pv. *tabaci*, συγκριτικά με φυτά αγρίου τύπου, έγινε σε διάστημα δύο, τεσσάρων, επτά και δέκα ημερών μετά τη μόλυνση. Τα φυτά εμφάνισαν

συμπτώματα της ασθένειας μόλις δύο ημέρες μετά τη μόλυνση, τα οποία, όπως αναμενόταν, εντεινόνταν με την πάροδο του χρόνου. Παρά το γεγονός ότι το σύνολο των φυτών εμφάνισαν συμπτώματα της ασθένειας, η συμπτωματολογία διέφερε μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών φυτών. Συγκεκριμένα, τα φυτά άγριου τύπου ανέπτυξαν συμπτώματα χλωρωτικών κηλίδων στα ανώτερα ή/και στα μεσαία φύλλα. Ομοίως, τα φυτά των σειρών *hpaB 1-2*, *hpaB 2-2* και *hpaB 4-2* ανέπτυξαν χλωρωτικές κηλίδες στα ανώτερα και μεσαία φύλλα καθώς και κύρτωση του ελάσματος. Οι εν λόγω μακροσκοπικές παρατηρήσεις είναι σύμφωνες με αναφορές σχετικά με τη συμπτωματολογία της ασθένειας σε φυτά καπνού που κυρίως περιλαμβάνει κίτρινες κηλίδες στα φύλλα, οι οποίες εξελίσσονται σε νεκρωτικές ή και μαύρες κατά την ξήρανση τους με γωνιακά περιθώρια (Young, et.al., 1978). Τα ανωτέρω, παρέχουν ενδείξεις ότι η απόκριση των φυτών αγρίου τύπου δε διαφοροποιείται από αυτή των διαγονιδιακών φυτών στη μόλυνση με το βακτήριο. Σημαντική εξαίρεση ωστόσο στα ανωτέρω αποτέλεσε η συμπτωματολογία της σειράς *hpaB 6-1*, η οποία ήταν ηπιότερη και αφορούσε αποκλειστικά σε περιορισμένο μαρασμό και χλώρωση του ελάσματος των φύλλων.

Η ανάπτυξη των εν λόγω συμπτωμάτων συμφωνεί με έρευνες που αναφέρουν ότι το βακτήριο *P. syringae* pv. *tabaci* μπορεί να προκαλέσει πιο έντονα συμπτώματα σε φυτά καπνού συγκριτικά με άλλα είδη (Balaz, 1977; Deall & Core, 1986), χωρίς ωστόσο να αναστέλλεται πλήρως η ανάπτυξή τους. Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο ότι η έκφραση του γονιδίου *hpaB* σε φυτά *N. benthamiana* δε συνοδεύτηκε από επαγωγή της HR, όπως έχει αναφερθεί για πρωτεΐνες προερχόμενες από βακτήρια, οι οποίες είτε συμβάλλουν στην παθογένεια σε φυτά ξενιστές είτε επάγουν την HR θέτοντας φραγμό στην περαιτέρω επέκταση του παθογόνου (Slot & Knogge, 2010).

Αναφορικά με την αποίκιση του βακτηρίου στα μολυσμένα φυτά, αυτή αξιολογήθηκε σε διάστημα 24 ωρών και 72 ωρών μετά τη μόλυνση των φυτών. Στις 24 ώρες μετά τη μόλυνση, αν και δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των κατηγοριών φυτών, τα φυτά άγριου τύπου εμφάνισαν μεγαλύτερο αριθμό αποικιών σε σύγκριση με τις διαγονιδιακές σειρές. Στα εκχυλίσματα της 2^{ης} αραίωσης ωστόσο, η σειρά *hpaB 2-2* εμφάνισε το μεγαλύτερο αριθμό αποικιών, ενώ οι σειρές *hpaB 4-2* και *hpaB 6-1* εμφάνισαν μηδενική αποίκιση. Στις 72 ώρες μετά τη μόλυνση, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα εκχυλίσματα της 1^{ης} αραίωσης, με τη σειρά *hpaB 2-2* να εμφανίζει τη μεγαλύτερη αποίκιση, ενώ στα εκχυλίσματα της 2^{ης} αραίωσης

δε σημειώθηκαν διαφορές μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών φυτών. Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα παρέχουν ενδείξεις σχετικά με την αυξημένη ευαισθησία της σειράς *hpaB* 2-2, η οποία προκύπτει από το συνδυασμό της συμπτωματολογίας και της αποίκισης του βακτηρίου στις 24 και 72 ώρες μετά τη μόλυνση. Αντίθετα, τα συνολικά δεδομένα υποδεικνύουν την πιθανή υπεροχή των σειρών *hpaB* 1-2 και *hpaB* 4-2 ως προς την ανθεκτικότητα έναντι του βακτηρίου.

Σχετικά με τη ποσότητα χλωροφύλλης, οι διαφορετικές κατηγορίες φυτών δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους, όπως προκύπτει από τις μέσες τιμές των μεταχειρίσεων. Σε διάστημα δέκα ημερών μετά τη μόλυνση, αν και η ποσότητα χλωροφύλλης δε διέφερε στους μάρτυρες των διαφορετικών κατηγοριών φυτών, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα μολυσμένα φυτά, οι οποίες αφορούσαν τόσο σε επίπεδο γονοτύπου όσο και σε επίπεδο μεταχείρισης. Μεταξύ των κατηγοριών φυτών, τη μεγαλύτερη τιμή εμφάνισαν τα φυτά αγρίου τύπου, ενώ η σειρά *hpaB* 6-1 εμφάνισε τη μικρότερη τιμή. Όπως αναμενόταν, σε επίπεδο μεταχείρισης, οι μέσες τιμές των μαρτύρων ήταν σημαντικά αυξημένες συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές των μολυσμένων φυτών. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές σχετικά με τη μείωση των τιμών της χλωροφύλλης σε φυτά καπνού έπειτα από μόλυνση με το βακτήριο *P. syringae* pv. *tabaci*. Σύμφωνα με αναφορές, το συγκεκριμένο βακτήριο παράγει την καπνοτοξίνη, πράσινη φθορίζουσα ουσία, η οποία συμβάλλει στη μείωση των επιπέδων χλωροφύλλης (Iqbal, et.al., 2012). Επίσης, έχει αναδειχθεί ότι στο είδος *N. benthamiana* η μόλυνση με *P. syringae* pv. *tabaci* επιφέρει μείωση της χλωροφύλλης, με αρνητική επίδραση στη δραστηριότητα του φωτοσυνθετικού συστήματος II (Photosystem II-PSII) καθώς και στην δραστηριότητα του φωτοσυνθετικού συστήματος I (Photosystem I-PSI), το μέγεθος της οποίας είναι ανάλογο με την εξέλιξη της ασθένειας (Cheng, et.al., 2016). Τέλος, η μόλυνση με *P. syringae* pv. *tabaci* έχει συσχετιστεί με την αποδόμηση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη λειτουργία των συγκεκριμένων φωτοσυνθετικών συστημάτων (Cheng, et.al., 2016).

Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της παρούσας διατριβής υποδεικνύουν ότι τα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν το γονίδιο *hpaB*, δεν εμφανίζουν στο σύνολό τους προηγμένη ανθεκτικότητα έναντι του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tabaci*. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι οι διαγονιδιακές σειρές διέφεραν ως προς την απόκρισή τους στη βακτηριακή μόλυνση, με τη σειρά *hpaB* 6-1 να χαρακτηρίζεται από ηπιότερη

συμπτωματολογία και τις σειρές *hpaB* 1-2 και *hpaB* 4-2 να εμφανίζουν μικρότερη αποίκιση συγκριτικά με τις υπόλοιπες σειρές και τα φυτά άγριου τύπου. Οι παρατηρηθείσες διαφορές μεταξύ των διαγονιδιακών σειρών αποδίδονται στην τυχαία ένθεση του γονιδίου *hpaB* καθώς οι σειρές συνιστούν απόγονους αυτογονιμοποίησης διαφορετικών συμβάντων μετασχηματισμού. Η διαφορετική ένθεση ενός διαγονιδίου, μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετική επαγωγή βιοχημικών μονοπατιών άμυνας έπειτα από την καταπόνηση, όπως αυτά του ιασμονικού οξέος (JA), του σαλικυλικού οξέος (SA), της σύνθεσης ενεργών μορφών οξυγόνου (AOS) και πρωτεϊνών παθογένεσης (PR), όπως έχει αποδειχθεί για διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν τη χαρπίνη *hrpZPspH* (Pavli, et al., 2011).

Σχετικά με το γονίδιο *hpaB*, προηγούμενες μελέτες έχουν καταδείξει την ικανότητα πρόκλησης ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων σε φυτά του είδους *N. benthamiana*. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι οι *hpaB*-σειρές παρουσιάζουν υψηλότερο δυναμικό βλάστησης και ανάπτυξης των σποροφύτων, συγκριτικά με φυτά άγριου τύπου, υπό συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας (Mitsopoulou, et.al., 2018). Στο επίπεδο αυτό, αξίζει να αναφερθεί ότι η ανθεκτικότητα έναντι της καταπόνησης ξηρασίας έχει στο παρελθόν συσχετιστεί με προηγμένη ανθεκτικότητα έναντι του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tabaci* σε φυτά του είδους *N. benthamiana* (Ramegowda, et.al., 2013).

Ενόψει των δεδομένων που υπογραμμίζουν ότι η διαγονιδιακή έκφραση γονιδίων βακτηριακής προέλευσης σε φυτά δύναται να οδηγήσει σε επίτευξη ευρείας ανθεκτικότητας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν ενδείξεις σχετικά με τη δυνατότητα αξιοποίησης του γονιδίου *hpaB*, από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *X. campestris* pv. *vesicatoria*, για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στόχο της διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hpaB*, που προέρχεται από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana*. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε συγκριτικά η απόκριση διαγονιδιακών *hpaB*-σειρών και φυτών αγρίου τύπου στη μόλυνση με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της μελέτης παρέχουν ενδείξεις ότι οι διαγονιδιακές *hpaB*-σειρές:

- Εμφανίζουν όμοια μορφολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά με τα φυτά αγρίου τύπου, υπογραμμίζοντας ότι το γονίδιο *hpaB* δεν επιφέρει αλλαγές στο φαινότυπο των φυτών και στην αναπτυξιακή τους ικανότητα.
- Εμφανίζουν παρόμοια συμπτωματολογία με τα φυτά αγρίου τύπου, έπειτα από μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, με τις διαφορετικές σειρές φυτών ωστόσο να διαφέρουν ως προς την ένταση και το χρόνο εκδήλωσης των συμπτωμάτων. Με βάση την απόκρισή τους στη βακτηριακή μόλυνση, η σειρά *hpaB 6-1* χαρακτηρίστηκε από ηπιότερη συμπτωματολογία, ενώ οι σειρές *hpaB 1-2* και *hpaB 4-2* εμφάνισαν μικρότερη αποίκιση συγκριτικά με τις υπόλοιπες σειρές και τα φυτά αγρίου τύπου.
- Απουσία καταπόνησης, δε διαφέρουν ως προς την ποσότητα χλωροφύλλης, συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου, ωστόσο η μόλυνση οδήγησε σε σημαντικές διαφορές τόσο σε επίπεδο γονοτύπου όσο και σε επίπεδο μεταχείρισης.

Με δεδομένες τις διαφορές μεταξύ των *hpaB*-σειρών, τα ευρήματα της διατριβής μπορεί να αποτελέσουν τη βάση για την περαιτέρω μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hpaB* σε διαγονιδιακά φυτά ως προς τη δυνατότητα αξιοποίησής του για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Achuo, E. A., Prinsen, E. & Höfte M. (2006). *Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to Botrytis cinerea and Oidium neolycopersici*. Plant Pathology, volume 55, issue 2, pages 178-186.
DOI: 10.1111/j.1365-3059.2006.01340.x
- Agrios, G. N. (2005). *How plants defend themselves against pathogens*. Plant Pathology (5th edition), pages 207-248.
DOI: 10.1016/B978-0-08-047378-9.50012-9
- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). *Phytoalexins in defense against pathogens*. Trends in Plant Science, volume 7, issue 12, pages 73-90.
DOI: 10.1016/j.tplants.2011.11.002
- Alfano, J. R. & Collmer, A. (2004). *Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense*. Annual Review of Phytopathology, volume 42, pages 385-414.
DOI: 10.1146/annurev.phyto.42.040103.110731.
- Atkinson, N. J. & Urwin, P. E. (2012). *The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field*. Journal of Experimental Botany, volume 63, Issue 10, pages 3523–3543.
DOI: 10.1093/jxb/ers100
- Bach-Pages, M. & Preston, G. M. (2018). *Methods to quantify biotic-induced stress in plants*. Methods in molecular biology, volume 1734, pages 241-255.
DOI: 10.1007/978-1-4939-7604-1_19
- Balaz, J. (1977). *Pseudomonas tabaci (Wolf & Foster) as a parasite of tobacco in Vojvodina*. Zastita Bilja, volume 28, issue 139, pages 85-95.
- Balint-Kurti, P. (2019). *The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences*. Molecular Plant Pathology, volume 20, issue 8, pages 1163-1178.
DOI: 10.1111/mpp.12821

- Bally, J., Jung, H., Mortimer, C., Naim, F., Philips, J. G., Hellens, R., Bombarely, A., Goodin, M. M. & Waterhouse, P. M. (2018). *The rise and rise of Nicotiana benthamiana: A plant for all reasons*. Annual Review of Phytopathology, volume 56, pages 405-426.
DOI: 10.1146/annurev-phyto-080417-050141
- Bari, R. & Jones, J. D. G. (2008). *Role of plant hormones in plant defence responses*. Plant Molecular Biology, volume 69, pages 473-488.
DOI: 10.1007/s11103-008-9435-0
- Baulcombe, D. (2004). *RNA silencing in plants*. Nature, volume 431, 356-363.
- Beachy, R. N. (1997). *Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants*. Current Opinion in Biotechnology, volume 8, issue 2, pages 215-220.
DOI: 10.1016/S0958-1669(97)80105-X
- Bilgin, D. D., Zavala, J. A., Zhu, J., Clough, S. J., Ort, D. R. & Delucia, E. H. (2010). *Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes*. Plant cell and environment, volume 33, issue 10, pages 1597-1613.
DOI: 10.1111/j.1365-3040.2010.02167.x
- Burke, E. J., Brown, S. J. & Christidis, N. (2006). *Modeling the recent evolution of global drought and projections for the twenty-first century with the Hadley Centre Climate Model*. J. Hydrometeor, volume 7, pages 1113–1125.
DOI: 10.1175/JHM544.1
- Büttner, D., Gürlebeck, D., Noël, L. D. & Bonas, U. (2004). *HpaB from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion*. Molecular Microbiology, volume 54, issue 3, pages 755-768.
DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04302.x
- Chakraborty, S., Moeder, W. & Yoshioka, K. (2017). *Plant Immunity*. Reference Module in Life Sciences.
DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.12154-5

- Cheng, DD., Sun, J. P., Chai, Y., Zhu, Y. Y., Zhao, M., Sun, G. Y. & Sun, X. B. (2016). *Effects of Pseudomonas syringae pv. tabaci infection on tobacco photosynthetic apparatus under light or dark conditions*. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao, volume 27, issue 8, pages 2655-2662.
DOI: 10.13287/j.1001-9332.201608.006
- Cheng, DD., Zhang, ZS., Sun, XB., Zhao, M., Sun, GY. & Chow, W. S. (2016) *Photoinhibition and photoinhibition-like damage to the photosynthetic apparatus in tobacco leaves induced by pseudomonas syringae pv. tabaci under light and dark conditions*. BMC Plant Biology, volume 16, issue 29.
DOI: 10.1186/s12870-016-0723-6
- Coburn, B., Sekirov, I. & Finlay, B. B. (2007). *Type III secretion systems and disease*. Clinical Microbiology Reviews, volume 20, issue 4, pages 535-549.
DOI: 10.1128/CMR.00013-07
- Cogoni, C. & Macino, G. (1999). *Posttranscriptional gene silencing in Neurospora by a RecQ DNA helicase*. Science, volume 286, issue 5448, pages 2342-2344.
DOI: 10.1126/science.286.5448.2342.
- Cohen, S. P. & Leach, J. E. (2019). *Abiotic and biotic stresses induce a core transcriptome response in rice*. Scientific reports 9, article number 6273.
DOI: 10.1038/s41598-019-42731-8
- Cushman, J. C. & Bohnert, H. J. (2000). *Genomic approaches to plant stress tolerance*. Current Opinion in Plant Biology, volume 3, issue 2, pages 117-124.
DOI: 10.1016/S1369-5266(99)00052-7
- Dangl, J. L. & Jones, J. D. G. (2001). *Plant pathogens and integrated defence responses to infection*. Nature, volume 411, pages 826-833.
DOI: 10.1038/35081161
- Deall M.W. & Core J.S. (1986). *A comparative study of the pathogenicity and epidemiology of strains of Pseudomonas syringae pv.tabaci that cause wildfire and angular leaf spot disease of tobacco in Zimbabwe*. Plant Pathology, volume 35, pages 74-81.

- Dodds, P. N. & Rathjen, J. P. (2010). *Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions*. Nature Reviews Genetics, volume 11, issue 8, page 539-548.
DOI: 10.1038/nrg2812
- Dong, H., Delaney, T. P., Bauer, D. W. & Beer, S.V. (1999). *Harpin induces disease resistance in Arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene*. Plant Journal, volume 20, pages 207-215.
DOI: 10.1046/j.1365-313x.1999.00595.x
- Eitas, T. & Dangl, J. (2010). *NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways*. Current Opinion in Plant Biology, volume 13, issue 4, pages 472-477.
DOI: 10.1016/j.pbi.2010.04.007
- English, J. J., Mueller, E. & Baulcombe, D. C. (1996). *Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes*. Plant cell, volume 8, issue 2, pages 179-188.
DOI: 10.1105/tpc.8.2.179
- Feng, F. & Zhou, J. M. (2012). *Plant-bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors*. Current Opinion in Plant Biology, volume 15, issue 4, pages 469–476.
DOI: 10.1016/j.pbi.2012.03.004
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C.C. (1998). *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, volume 391, pages 806-811.
DOI: 10.1038/35888
- Food, Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2004). FAO production yearbook. FAO, Rome.
- Freeman, B. C. & Beattie, G. A. (2008). *An overview of plant defenses against pathogens and herbivores*. The Plant Health Instructor.
DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01

- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, volume 67, issue 1, pages 16-37.
DOI: 10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003
- Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A. & Lommel, S. A. (2007). *Nicotiana benthamiana: its history and future as a model for plant–pathogen interactions*. Molecular Plant-Microbe Interactions, volume 21, issue 8, pages 1015-1026.
DOI: 10.1094/ MPMI -21-8-1015
- Goulet, M. C., Gaudreau, L., Gagné, M., Maltais, A. M., Laliberté, A. C., Éthier, G., Bechtold, N., Martel, M., D’Aoust, M. A., Gosselin, A., Pepin, S. & Michaud, D. (2019). *Production of biopharmaceuticals in Nicotiana benthamiana—Axillary stem growth as a key determinant of total protein yield*. Frontiers in Plant Science, volume 10, issue 735.
DOI: 10.3389/fpls.2019.00735
- Guan-Zhu, H. (2018). *Origin and evolution of the plant immune system*. New Phytologist, volume 222, issue 1, pages 70-83.
DOI: 10.1111/nph.15596
- Gull, A., Lone, A. & Wani, N. (2019). *Biotic and Abiotic Stresses in Plants*. Abiotic and Biotic Stress in Plants.
DOI: 10.5772/intechopen.85832
- Hewezi, T. & Baum, T. J. (2013). *Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors*. Molecular Plant Microbe Interactions, volume 26, issue 1, pages 9–16.
DOI: 10.1094/MPMI -05-12-0106-FI
- Horsch, R. B., Rogers, S. G. & Fraley, R. T. (1985). *Transgenic plants*. Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology, volume 50, pages 433-437.
DOI: 10.1101/sqb.1985.050.01.054
- Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K. & Bonas, U. (1998). *hpaA mutants of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction*. Molecular

Microbiology, volume 29, issue 6, pages 1379-1390.

DOI :10.1046/j.1365-2958.1998.01019.x

- Iqbal, M. J., Goodwin, P. H., Leonardos, E. D. & Grodzinski B. (2012). *Spatial and temporal changes in chlorophyll fluorescence images of Nicotiana benthamiana leaves following inoculation with Pseudomonas syringae pv. tabaci*. Plant Pathology, volume 61, issue 6.
DOI: 10.1111/j.1365-3059.2012.02592.x
- Jackson, R. D. (1986). *Remote sensing of biotic and abiotic plant stress*. Annual review of Phytopathology, volume 24, pages 265-287.
DOI: 10.1146/annurev.py.24.090186.001405
- Jaeger, G. D., Wilde, C. D., Eeckhout, D., Fiers, E. & Depicker, A. (2000). *The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance*. Plant Molecular Biology, volume 43, pages 419-428.
DOI: 10.1023/A:1006471528756
- Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. (2006). *The plant immune system*. Nature, volume 444, pages 323-329.
DOI: 10.1038/nature05286
- Kant, M. R., Jonckheere, W., Knecht, B., Lemos, F., Liu, J., Schimmel, B. C. J., Villarroel, C. A., Ataide, L. M. S., Dermauw, W., Glas, J. J., Egas, M., Janssen, A., Van Leeuwen, T., Schuurink, R. C., Sabelis, M. W. & Alba, J. M.. (2015). *Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities*. Annals of Botany, volume 115, issue 7, pages 1015-1051.
DOI: 10.1093/aob/mcv054
- Kamoun, S. (2006). *A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes*. Annual Review of Phytopathology, volume 44, pages 41–60.
DOI: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436
- Ko, K., Brodzik, R. & Steplewski, Z. (2009). *Production of antibodies in plants: approaches and perspectives*. Plant-produced Microbial Vaccines, volume 332, pages 55-78.
DOI: 10.1007/978-3-540-70868-1_4

- Leonard, S., Hommais, F., Nasser, W. & Reverchon, S. (2017). *Plant-phytopathogen interactions: bacterial responses to environmental and plant stimuli*. Environmental microbiology, volume 19, issue 5, pages 1689-1716.
DOI: 10.1111/1462-2920.13611.
- Lichtenthaler, H. K. (1998). *The stress concept in plants: an introduction*. Annals of the New York Academy of Sciences, volume 851, pages 187-98.
DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08993.x.
- Lindeberg, M., Cunnac, S. & Collmer, A. (2012). *Pseudomonas syringae type III effector repertoires: Last words in endless arguments*. Trends in Microbiology, volume 20, issue 4, pages 199–208.
DOI: 10.1016/j.tim.2012.01.003
- Lombardi, C., Tolchard, J., Bouillot, S., Signor, L., Gebus, C., Liebl, D., Fenell, D., Teulon, J. M., Brock, J., Habenstein, B., Pellequer, J. L., Faudry, E., Loquet, A., Attrée, I., Dessen, A. & Job, V. (2019). *Structural and functional characterization of the Type three secretion system (T3SS) needle of Pseudomonas aeruginosa*. Front. Microbiol., volume 10.
DOI: 10.3389/fmicb.2019.00573
- Lomonossoff, G. P. (1995). *Pathogen-derived resistance to plant viruses*. Annual Review of Phytopathology, volume 33, pages 323-343.
DOI: 10.1146/annurev.py.33.090195.001543
- Lonjon, F., Lohou, D., Cazalé, A. C., Büttner, D., Ribeiro, B. G., Péanne, C., Genin, S. & Vailleau, F. (2017). *HpaB-dependent secretion of Type III effectors in the plant pathogens Ralstonia solanacearum and Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*. Scientific Reports, volume 7, article number 4879.
DOI: 10.1038/s41598-017-04853-9
- Lorenz, C., Kirchner, O., Egler, M., Stuttmann, J., Bonas, U. & Büttner, D. (2008). *HpaA from Xanthomonas is a regulator of type III secretion*. Molecular Microbiology, volume 69, issue 2, pages 344-360.
DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06280.x

- Mak, T. W. & Saunders, M. E. (2006). *Comparative Immunology*. The Immune Response Basic and Clinical Principles, pages 611-637.
DOI: 10.1016/B978-012088451-3.50023-5
- Mitsopoulou, N., Kelaidi, G. & Skaracis, G. (2018). *The hpaB gene from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria enhances abiotic stress tolerance in transgenic N. benthamiana*. 69th Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- Mittler, R. (2006). *Abiotic stress, the field environment and stress combination*. Trends in Plant Science, volume 11, issue 1, pages 15-19.
- Mohanta, T. K., Bashir T., Hashem, A. & Allah, E. F. (2017). *Systems biology approach in plant abiotic stresses*. Plant Physiology and Biochemistry, volume 121, pages 58-73.
DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.10.019.
- Mohr, P. G. & Cahill, D. M. (2003). *Absciscic acid influences the susceptibility of Arabidopsis thaliana to Pseudomonas syringae pv. tomato and Peronospora parasitica*. Functional Plant Biology, volume 30, issue 4, pages 461-469.
DOI:10.1071/FP02231
- Monaghan, J. & Zipfel, C. (2012). *Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane*. Current Opinion in Plant Biology, volume 15, issue 4, pages 349-357. DOI: 10.1016/j.pbi.2012.05.006
- Munns, R. & Tester, M. (2008). *Mechanisms of salinity tolerance*. Annual Review of Plant Biology, volume 59, pages 651-681.
DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
- Nürnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. & Piater, L. (2004). *Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences*. Immunological Reviews, volume 198, pages 249-266.
DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.0119.x.
- Pavli, O., Kelaidi, G., Tampakaki, A. & Skaracis G. (2011). *The hrpZ gene of Pseudomonas syringae pv. phaseolicola enhances resistance to rhizomania*

disease in transgenic Nicotiana benthamiana and sugar Beet. PLoS ONE, volume 6, issue 3.

- Pavli, O., Tampakaki, A. & Skaracis G. (2012). *High level resistance against rhizomania disease by simultaneously integrating two distinct defense mechanisms*. PLoS ONE, volume 7, issue 12.
- Perez-Lopez, U., Miranda-Apodaca, J., Munoz-Rueda, A. & Mena-Petite, A. (2013). *Lettuce production and antioxidant capacity are differentially modified by salt stress and light intensity under ambient and elevated CO₂*. Journal of Plant Physiology, volume 170, pages 1517–1525.
DOI: 10.1016/j.jplph.2013.06.004
- Pimentel, D. (1991). *Diversification of biological control strategies in agriculture*. Crop Protection, volume 10, issue 4, pages 243-253.
DOI: 10.1016/0261-2194(91)90001-8
- Prasad, P. V. V., Pisipati, S.R., Momčilović, I. & Ristic, Z. (2011). *Independent and combined effects of high temperature and drought stress during grain filling on plant yield and chloroplast EF-Tu expression in spring wheat*. Journal of Agronomy and Crop Science, volume 197, pages 430–441.
DOI: 10.1111/j.1439-037X.2011.00477.x
- Prins, M.W., Laimer, M., Noris, E, Schubert, J., Wassenegger, M. & Tepfer, M. (2008). *Strategies for antiviral resistance in transgenic plants*. Journal Molecular Plant Pathology, volume 9, issue 1, pages 73-83.
DOI: 10.1111/J.1364-3703.2007.00447.X
- Puhar, A. & Sansonetti, P. J. (2014). *Type III secretion system*. Current Biology, volume 24, issue 17, pages 784-791.
DOI: 10.1016/j.cub.2014.07.016
- Ramegowda, V., Senthil-Kumar, M., Ishiga, Y., Kaundal, A., Udayakumar, M. & Mysore, K. S. (2013). *Drought stress acclimation imparts tolerance to Sclerotinia sclerotiorum and Pseudomonas syringae in Nicotiana benthamiana*. International Journal of Molecular Science, volume 14, issue 5, pages 9497-9513.
DOI:10.3390/ijms14059497

- Rejeb, I. B., Pastor, V. & Mauch-Mani, B. (2014). *Plant responses to Simultaneous biotic and abiotic stress: Molecular mechanism*. Interaction Between Abiotic and Biotic Stresses in Plants, volume 3, issue 4, pages 458-475. DOI: 10.3390/plants3040458
- Rosenzweig, C., Iglesias, A., Yang, X. B., Epstein, P. R. & Chivian, E. (2001). *Climate change and extreme weather events - Implications for food production, plant diseases, and pests*. Global change & human health, volume 2, number 2, pages 90-104.
- Russell, P. J. (2013). *ιGenetics Μια Μεντελική Προσέγγιση*. (Γενική επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Αφέντρα Αμαλία-Σοφία, Μιχαηλίδης Θεολόγος, Πάσχου Περιστερά, Τριανταφυλλίδης Αλέξανδρος, Φακής Γιαννούλης). Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
- Sanford, J. C. & Johnston, S. A. (1985). *The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome*. Journal of Theoretical Biology, volume 113, issue 2, pages 395-405. DOI: 10.1016/S0022-5193(85)80234-4
- Sarris, D. & Koutsias, N. (2014). *Ecological adaptations of plants to drought influencing the recent fire regime in the Mediterranean*. Agricultural and Forest Meteorology, volume 184, pages 158-169. DOI: 10.1016/j.agrformet.2013.09.002
- Slot, K. A. E. & Knogge, W. (2010). *A dual role for microbial pathogen-derived effector proteins in plant disease and resistance*. Critical Reviews in Plant Sciences, volume 21, issue 3, pages 229-271. DOI: 10.1080/0735-260291044223
- Srivastava G., Kumar, S., Dubey, G., Mishra, V. & Prasad, S. M. (2012). *Nickel and ultraviolet-B stresses induce differential growth and photosynthetic responses in Pisum sativum L. seedlings*. Biological Trace Element Research, volume 149, pages 86–96. DOI: 10.1007/s12011-012-9406-9
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E. & Mittler, R. (2014). *Abiotic and biotic stress combinations*. Tansley Reviews.

DOI: 10.1111/nph.12797

- Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology* (3rd edition). Sunderland: Sinauer Associates.
- Taiz, L., Zeiger, E., Max Moller, I. & Murphy, A. (2017). *Φυσιολογία και Ανάπτυξη Φυτών* (2^η έκδοση). (Γενική επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Κωνσταντίνος Θάνος). Αθήνα: Utopia
- Tampakaki, A. P. (2014). *Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria*. *Frontiers in Plant Science*, volume 5, issue 114.
DOI: 10.3389/fpls.2014.00114
- Ueki, S., Magori, S., Lacroix, B. & Citovsky, V. (2013). *Transient gene Expression in epidermal cells of plant leaves by biolistic DNA delivery*. *Methods in Molecular Biology*, volume 940, pages 17-26.
DOI: 10.1007/978-1-62703-110-3_2
- Vaishnav, P. & Demain, A. L. (2009). *Industrial Biotechnology, (overview)*. *Encyclopedia of Microbiology* (3rd edition), pages 335-348.
DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00150-4
- Vaucheret, H., Be'clin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Mourrain, P., Palauqui J. C. & Vernhettes, S. (1998). *Transgene-induced gene silencing in plants*. *The Plant Journal*, volume 16, issue 6, pages 651–659.
- Verma, S., Nizam, S. & Verma, P. K. (2013). *Biotic and abiotic stress signalling in plants*. *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective*, volume 1, pages 25-49.
DOI: 10.1007/978-1-4614-6372-6_2
- Wang, B., Zhou, J., Wang, Y., Teixeira da Silva, J. A. & Zhu, L. (2006). *Physical stress and plant growth*. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, Global Science Books, volume 3, pages 68-85.
- Wang, W.X., Vinocur, B., Shoseyov, O. & Altman, A. (2001). *Biotechnology of plant osmotic stress tolerance physiological and molecular considerations*. *Acta Horti*, volume 560, pages 285-292.
DOI: 10.17660/ActaHortic.2001.560.54

- Wieczorek, A. & Wright, M. (2012). *History of agricultural biotechnology: How crop development has evolved*. Nature Education Knowledge, volume 3, issue 10, page 9.
- Wu, F. S. & Feng, T. Y. (1999). *Delivery of plasmid DNA into intact plant cells by electroporation of plasmolyzed cells*. Plant Cell Reports, volume 18, issue 5, pages 381-386.
DOI: 10.1007/s002990050590
- Young, J. M., Dye, D. W., Bradbury, J. F., Panagopoulos, C. G. & Robbs, C. F. (1978). *A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria*. Journal of Agricultural Research, volume 21, issue 1, pages 153-177.
DOI: 10.1080/00288233.1978.10427397
- Zhang, Z., Tariq, A., Zeng, F., Graciano, C. & Zhang, B. (2020). *Nitrogen application mitigates drought-induced metabolic changes in Alhagi sparsifolia seedlings by regulating nutrient and biomass allocation patterns*. Plant physiology and biochemistry, volume 155, pages 828-841.
DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.08.036
- Zhang, L., Xiao, S., Li, W., Feng, W., Li, J., Wu, Z., Gao, X., Liu, F. & Shao M. (2011). *Overexpression of a Harpin-encoding gene hrfl in rice enhances drought tolerance*. Journal of Experimental Botany, volume 62, issue 12, pages 4229–4238.
DOI: 10.1093/jxb/err131
- Zimmermann, S., Schillberg, S., Liao, Y. C. & Fisher, R. (1998). *Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in shape Nicotiana tabacum*. Molecular Breeding, volume 4, pages 369-379.
DOI: 10.1023/A:1009638600492

Ελληνική Βιοβιβλιογραφία

- Γαλάτης, Β., Γανωτάκης, Δ., Γκάνη-Σπυροπούλου, Κ., Καραμπουρνιώτης, Γ., Κοτζαμπάσης, Κ., Κωνσταντινίδου, Ε. Ι., Μανέτας, Ι. & Ρουμπελάκη-Αγγελάκη,

- K. A. (2003). *Φυσιολογία Φυτών από το μόριο στο περιβάλλον*. Κρήτη: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Καραμπουρνιώτης, Γ., Λιακόπουλος, Γ. & Νικολόπουλος, Δ. (2012). *Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών*. Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.
 - Ρουπακιάς, Δ. Γ. (2010). *Βελτίωση φυτών*. Θεσσαλονίκη: University Studio Press.
 - Ταμπακάκη, Α. Π. (1999). *Μοριακή και βιοχημική μελέτη πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III στο φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* και διερεύνηση του ρόλου του στην Αντίδραση Υπερευαισθησίας των φυτών*. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, Ηράκλειο.
 - Τζάμος, Ε. Κ.. (2017). *Φυτοπαθολογία*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη.

Διαδικτυακή Βιβλιογραφία

- <http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/SITEGRAPHICS/Agrotrans.GIF>
- https://en.wikipedia.org/wiki/Type_three_secretion_system#/media/File:T3SS_needle_complex.svg
- <http://orbitbiotech.com/temperature-stress-plants-high-temperature-stress/responses-of-a-plant-againstabiotic-stress-orbit-biotech-training/>

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Πίνακας 7.1: Τιμές χλωροφύλλης των φυτών άγριου τύπου (WT), πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. tabaci.

Σειρά	Μεταχείριση	Επανάληψη	Πριν τη μόλυνση			Μετά τη μόλυνση		
			1	2	M.O.	1	2	M.O.
wt	Μάρτυρες C	1	18,4	20,1	19,25	24,7	26,9	25,8
		2	19,4	19,8	19,6	21,3	22,8	22,05
		3	19,6	22,1	20,85	31	28,5	29,75
		4	17,5	16,9	17,2	27,1	23,4	25,25
		5	19,2	19,8	19,5	39,3	34,3	36,8
	Μολυσμένα φυτά	1	21,8	20,8	21,3	23,7	28,6	26,15
		2	21,4	20,8	21,1	30,4	34,2	32,3
		3	18	19,1	18,55	25,9	27	26,45
		4	24,9	23,9	24,4	30	27,8	28,9
		5	17,7	19,1	18,4	25,8	25,6	25,7

Πίνακας 7.2: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaB 1-2*, πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. tabaci.

Σειρά	Μεταχείριση	Επανάληψη	Πριν τη μόλυνση			Μετά τη μόλυνση		
			1	2	M.O.	1	2	M.O.
<i>hpaB 1-2</i>	Μάρτυρες C	1	18,1	20,9	19,5	31	31,3	31,15
		2	23,7	23,2	23,45	26	28,5	27,25
		3	18,6	19,8	19,2	26,3	29,3	27,8
		4	20,9	22,4	21,65	33,6	29,9	31,75
		5	23	23,4	23,2	36	37	36,5
	Μολυσμένα φυτά	1	20,1	17,3	18,7	35,6	31	33,3
		2	19,7	17,7	18,7	22,9	19,6	21,25
		3	20,5	23,8	22,15	28	29,6	28,8
		4	13	14,5	13,75	22,9	23	22,95
		5	22,3	23,9	23,1	22,9	22,8	22,85

Πίνακας 7.3: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaB 2-2*, πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. tabaci.

Σειρά	Μεταχείριση	Επανάληψη	Πριν τη μόλυνση			Μετά τη μόλυνση		
			1	2	M.O.	1	2	M.O.
<i>hpaB 2-2</i>	Μάρτυρες C	1	18,7	16,7	17,7	36,3	31	33,65
		2	17,9	19	18,45	36,9	36,6	36,75
		3	24,3	22,5	23,4	34,7	29,4	32,05
		4	20,3	20,2	20,25	26,1	24,6	25,35
		5	26,8	26,5	26,65	22,6	20,5	21,55
		6	25,2	25,4	25,3	22,4	21,8	22,1

Μολυσμένα φυτά	1	19,6	19,1	19,35	22,8	21,6	22,2
	2	18,4	23,6	21	34	38,1	36,05
	3	19,6	16,9	18,25	24,2	29,6	26,9
	4	16,4	17,9	17,15	28,8	28,2	28,5
	5	17,2	19,7	18,45	-	-	-

Πίνακας 7.4: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaB 4-2*, πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρά	Μεταχείριση	Επανάληψη	Πριν τη μόλυνση			Μετά τη μόλυνση		
			1	2	M.O.	1	2	M.O.
<i>hpaB 4-2</i>	Μάρτυρες C	1	24,3	25,7	25	24,2	28,8	26,5
		2	18,3	18,4	18,35	31,9	26,3	29,1
		3	20,4	22,9	21,65	31,1	32,4	31,75
		4	26,8	27,2	27	22,6	29,1	25,85
		5	17,3	20,7	19	39,4	33,1	36,25
		6	23,3	21,6	22,45	39	32,1	35,55
	Μολυσμένα φυτά	1	19,6	19,3	19,45	28,4	25	26,7
		2	16,5	20,1	18,3	29,3	26,8	28,05
		3	17,2	18,7	17,95	29,7	29,1	29,4
		4	17,5	20,1	18,8	21,7	27,3	24,5
		5	15,4	17,5	16,45	28,2	28,6	28,4

Πίνακας 7.5: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaB 6-1*, πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρά	Μεταχείριση	Επανάληψη	Πριν τη μόλυνση			Μετά τη μόλυνση		
			1	2	M.O.	1	2	M.O.
<i>hpaB 6-1</i>	Μάρτυρες C	1	17,7	22,4	20,05	26,5	33	29,75
		2	21,2	22	21,6	26,9	30,8	28,85
		3	21,8	23,7	22,75	26,9	32,3	29,6
		4	21,6	21,8	21,7	30,9	26,4	28,65
		5	20,5	18,8	19,65	23,1	23,5	23,3
	Μολυσμένα φυτά	1	19,9	20,1	20	25,4	23,8	24,6
		2	14,3	13,2	13,75	25,6	22,2	23,9
		3	16,4	16,5	16,45	25	27,3	26,15
		4	16,1	15,4	15,75	22,3	21,2	21,75
		5	15,5	13,5	14,5	20,7	23,2	21,95

Πίνακας 7.6: Μέσος όρος τιμών χλωροφύλλης των μαρτύρων και των μολυσμένων φυτών ανά κατηγορία φυτών (WT και *hpaB*-), πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρά Μεταχείριση	Πριν τη μόλυνση		Μετά τη μόλυνση	
	Μάρτυρες C	Μολυσμένα φυτά	Μάρτυρες C	Μολυσμένα φυτά
WT	19,28	20,75	27,98	34,33
<i>hpaB</i> 1-2	21,63	19,28	31,05	25,83
<i>hpaB</i> 2-2	21,96	18,84	28,57	28,41
<i>hpaB</i> 4-2	22,24	18,19	30,83	27,41
<i>hpaB</i> 6-1	21,15	16,09	28,03	23,67